ISSN 1669-9106

MEDICINA (Buenos Aires) 2015; 75 (Supl. II): 46-219

RESÚMENES DE LAS COMUNICACIONES

PREMIO SAFIS

(255) BENZNIDAZOL (BZL) INDUCE LA EXPRESIÓN HEPÁTICA DE NRF2, AUMENTA LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y MODULA LA EXPRESIÓN DE TLR-4 EN UN MODELO MURINO DE SEPSIS POLIMICROBIANA

Flavia Lambertuccci[1]; Omar Motino[2]; Silvina Villar[3]; Juan P Rigalli[1]; Paloma Martin-Sanz[2]; Cristina E Carnovale[1]; Daniel E Frances[1]; María T Ronco[1]

IFISE[1] Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alnerto Sols", Madrid España[2] Instituto de Inmunología Clínica y Experimental de Rosario (IDICER)[3]

Los mecanismos moleculares de la progresión de la sepsis se asocian a un desbalance entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y su neutralización por las enzimas antioxidantes. Estudios previos del grupo demostraron que la droga antiparasitaria BZL tiene efectos inmunomoduladores evidenciados por su capacidad de aumentar la sobrevida de ratones C57BL/6 sometidos a un modelo de sepsis polimicrobiana de ligadura y punción cecal (CLP). El objetivo del presente trabajo es analizar en el hígado de ratones sometidos a CLP, el efecto del BZL sobre el estado redox hepático y su asociación con el receptor de inmunidad innata TLR4 y el factor Nrf2. Se utilizaron ratones C57BL/6 de 8-10 semanas que fueron separados en 4 grupos (n=6): Sham; Sham+BZL; CLP; CLP+BZL. El BZL se administró por sonda naso gástrica, 25 mg/kg pc, 2 horas antes de la cirugía y cada 12 hs post-CLP. Los animales Sham y CLP recibieron el vehículo del BZL. Los animales fueron sacrificados a las 24 hs post-cirugía. En los ratones sometidos a CLP, BZL disminuye la expresión en membrana plasmática del receptor TLR-4 (Western blot, Sham: 100±6,0; Sh+BZL: 96,0±12,4; CLP: 133,9±9,9*, CLP+BZL:52,4±1,9#) (*p<0,05 vs Sham; #p<0,05 vs CLP). Los animales CLP tratados con BZL mostraron una disminución significativa en los niveles de ROS evaluados por TBARS (-52,1%), y por la actividad (-40%) y expresión (-65,6%) de la enzima NADPH oxidasa con un aumento significativo en la capacidad antioxidante hepática total (actividad y expresión de SOD1, SOD2 y catalasa). Además, BZL aumentó significativamente en animales sometidos a CLP, la expresión del mRNA hepático del factor Nrf2 (+58,8%) y de la proteína en la fracción nuclear (+95,4%). Nuestros resultados demuestran que, en un modelo murino de sepsis, BZL induce la activación hepática de Nrf2 con el concomitante aumento de las enzimas antioxidantes que bloquean la producción de ROS y la respuesta inflamatoria por disminución de la expresión de TLR4.

(623) CÁNCER HEPÁTICO, CARBOXILESTERASAS Y ACEITE DE PESCADO: UNA AMISTAD POCO FIABLE

Ariel D Quiroga[12]; María Paula Ceballos[1]; Juan Pablo Parody[1]; Florencia Lorenzetti[1]; María De Lujan Alvarez[12]; María Cristina Carrillo[12]

Instituto de Fisiología Experimental[1] Área Morfología. FCByF. UNR[2]

La incidencia del carcinoma hepatocelular (HCC) está creciendo drásticamente en el mundo occidental debido al incremento de afecciones hepáticas de base tales como el hígado graso no alcohólico. Aquí, estudiamos el metabolismo lipídico y el rol de la enzima Ces3/TGH en un modelo de desarrollo temprano de cáncer hepático en ratas. Los animales IP son más delgados (-24%) que los animales C e hipertrigliceridémicos (40%). La expresión proteica y génica de Ces3/TGH en los animales IP se vio significativamente disminuida respecto de los animales C. También presentaron aumento de la secreción de VLDL y de la secreción de apoB100. Además, los animales IP presentaron aumento de la expresión hepática de genes lipogénicos. También mostraron mayor expresión de ARNm de enzimas de oxidación/transporte de AG y de secreción de lipoproteínas. Los hepatocitos de ratas IP presentan actividad acetiltransferasa incrementada y de novo lipogénesis normal. La administración de aceite de pescado (AP) en la dieta mejora el estado metabólico general en ratas IP. La expresión hepática de Ces3/TGH en los animales IP fue similar a la de animales C. Además, el suplemento previno la pérdida de peso en ratas IP en comparación con las ratas IP. El suplemento también mejoró las concentraciones plasmáticas y hepáticas de TG, PL y FC en ratas IP. Las secreciones apoB100 y VLDL se normalizaron en ratas IP con consumo de AP. El AP indujo una fuerte oxidación hepática de AG. Finalmente, el tratamiento con AP redujo ~50% el número total de focos de hepatocitos alterados (FHA) respecto del grupo IP y redujo el tamaño de los mismos (28% en las ratas tratadas con AP respecto de IP). El metabolismo lipídico se altera significativamente en las primeras etapas del desarrollo del cáncer hepático, debido posiblemente a alteraciones de carboxilesterasas.

(7) NIVELES ELEVADOS DE T4 PROVOCAN MODIFICACIONES NEURO-GLIO-VASCULARES DURANTE LA REGENERACION RETINIANA DE ZEBRAFISH (DANIO RERIO) ADULTO.

Claudio A Bejarano; María P Faillace

IFIBIO HOUSSAY

Las hormonas tiroideas actúan a través de receptores específicos (TRs). El VEGF y sus receptores (VEGFRs) cumplen un rol fundamental en la formación y mantenimiento de los vasos. Desequilibrios en estas vías participan en diversas patologías neurodegenerativas. El zebrafish (ZF) es un modelo experimental establecido ya que regenera varios órganos y tejidos, incluyendo la retina. Se investigó el efecto de la exposición prolongada a niveles elevados de T4 sobre la diferenciación neuro-glio-vascular en el proceso de regeneración retiniana. Se examinó el efecto de T4 sobre la expresión de los TRs y VEGFRs en retinas de ZF con o sin lesión. Se lesionaron las retinas de ZF con una inyección intravítrea única de Ouabaína (O) o el grupo control con salina (S). Los ZF se trataron con T4 (300 µg/L, T) o con vehículo (0.1 M NaOH, V) hasta 25 días post lesión (25 dpi). Se conformaron los siguientes grupos: SV, ST, OV, OT. Se procedió a la eutanasia a los 25 dpi. Se detectaron poblaciones neuronales y vasos sobre cortes de retina por inmunofluorescencia. Se determinó la expresión de ARNms de PKC, GFAP y los TRs y VEGFRs por RT-PCR estándar y cuantitativa. A los 25 dpi, se observó una disminución significativa de células amácrinas, en ST y OT con respecto a los grupos no tratados con T4. En particular en OT: se observó una disminución significativa en el número de células Bipolares (CBs). Se evidenciaron además cambios morfológicos en las CBs y en las capas sinápticas. Se observó en la glia de Müller, un incremento de la inmunorreactividad de GFAP. Se determinaron variaciones significativas en los niveles de ARNm de GFAP, PKC, TRs y VEGFRs. Se describió un incremento de la vascularización en los grupos tratados con T4. En estos grupos se evidenciaron cambios en el ancho de las capas nucleares. Finalmente, proponemos que los niveles elevados de T4 modi-

fican los procesos de diferenciación neuro-glio-vascular durante la regeneración y el crecimiento retinianos.

(488) EVENTOS NEUROADAPTATIVOS EN LA PROGENIE ADULTA INDUCIDOS POR LA ESTIMULACIÓN CRÓNICA PERINATAL DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (RAS)

Ana Fabiola Macchione; Laura Vivas Inst. Ferreyra
INIMEC - CONICET- UNC

Evidencias de nuestro y otros laboratorios muestran que los mecanismos y circuitos implicados en el balance hidrosalino son vulnerables a los efectos de la programación perinatal dada por alteraciones del ambiente intrauterino y/o postnatal. En el presente trabajo se investigaron los efectos programadores de la estimulación crónica del RAS dada por la ligadura parcial de la aorta abdominal (PAL) sobre el patrón de ingesta de agua y sodio y la actividad neuronal (inmunomarcación de Fos, Fos-ir), observados en la etapa adulta frente a una depleción aguda de sodio (Furosemida; 40mg/kg sc) y dieta baja en sodio **[F/DBS]**. Se estudiaron además los patrones de ingesta materno y los niveles en plasma de electrolitos y actividad de renina (PRA) al destete en madres y crías. Los grupos de manipulación perinatal (MP) fueron: i) PAL/solución hipertónica de sodio/agua [**MP-PAL**]; ii) solución hipertónica de sodio/ [**MP-Na**] y iii) solo agua **[MP-Agua]**. La MP comenzó una semana antes del inicio de la gestación y duró hasta el mes de vida de la progenie. Las madres MP-PAL mostraron un aumento en los niveles de PRA y en la ingesta de agua y fluidos totales y una caída en la osmolaridad. De manera contrapuesta, las crías MP-PAL mostraron un aumento en la natremia y osmolaridad. En la progenie adulta MP-PAL sujeta a F/DBS se observó una disminución en la ingesta de agua y sodio en acompañado de un aumento en el número de células Fos-ir en el núcleo dorsal del rafe. Este núcleo forma parte de un circuito que inhibe tónicamente la ingesta de fluidos; por lo tanto es posible suponer que la ingesta disminuida de fluidos en animales MP-PAL pueda deberse a una desensibilización de este núcleo, impidiendo el gatillado normal de la respuesta ingestiva inducida por F/DBS. Estos datos evidencian eventos neuroadaptativos fruto de procesos de programación perinatal a largo plazo que afectan la recepción de señales y la actividad de los circuitos cerebrales implicados en la homeostasis hidrosalina.

(221) LA MELATONINA (M) PREVIENE LOS DAÑOS EN EL CEREBRO FETAL Y LAS SECUELAS EN EL ADULTO EN UN MODELO MURINO DE PARTO PREMATURO (PP) INDUCIDO POR LIPOPOLISACÁRIDO (LPS)

Ana Paula Domínguez Rubio; María Victoria Bariani; Julieta Aisemberg; Julieta Blanco; Ruth Estela Rosenstein; María Aurelia Zorrilla Zubilete; Ana María Franchi
CEFYBO

El PP es la principal causa de morbi-mortalidad perinatal y no existe una terapéutica eficaz para su prevención. Hemos desarrollado un modelo donde la administración de LPS en el día 15 de gestación provoca 100% de PP y la M lo previene en el 50% de los casos. El objetivo fue analizar si la M puede prevenir el daño en el cerebro fetal inducido por LPS y estudiar si las crías provenientes de hembras donde la M previno el PP presentan secuelas en su desarrollo. Los cerebros fetales (día 15 de gestación) provenientes de hembras control (C), tratadas con M o con M+LPS presentan una estructura conservada de la sustancia gris y blanca, como así también de las estructuras meníngeas. En cambio, el tratamiento con LPS produce infiltración linfocitaria que dificulta la visualización de las sustancias gris y blanca. Asimismo el LPS incrementó la expresión de los RNAm de IL1-β, óxido nítrico sintasa inducible y neuronal (RT-PCR), y el tratamiento con M lo revirtió ($p<0.05$). Los inhibidores de las histonas deacetilasas (HDAC) previenen procesos inflamatorios, por ello se ensayaron dos inhibidores de HDAC (resveratrol y tricostatina A) y ambos previnieron el PP y las consecuencias en las crías, sugiriendo que modificaciones epigenéticas están involucradas en estos fenómenos. Las crías provenientes de hembras tratadas con M+LPS no difirieron de las de las C en cuanto a la separación del pabellón auricular, la erupción de los dientes y la apertura ocular. Tanto la actividad exploratoria, los niveles de comportamiento asociados a la ansiedad y memoria de habituación (test de campo abierto), los niveles de comportamiento asociados a la ansiedad (test de laberinto en cruz elevado) y la memoria asociativa (test de evitación inhibitoria) no difirieron entre las crías provenientes de hembras tratadas con M+LPS con respecto a las C. Estos resultados sugieren que la M podría contribuir a un nuevo abordaje terapéutico para la prevención de las secuelas de los nacidos prematuramente.

PREMIO LEÓN CHERNY EN MESA INTERDISCIPLINARIA

(549) ESFINGOLÍPIDOS Y LÁSER DE BAJA INTENSIDAD: ¿POSIBLES ESTRATEGIAS PARA RESTAURAR LA FERTILIDAD EN LA FALLA OVÁRICA PREMATURA INDUCIDA POR QUIMIOTERAPIA?

Natalia M Pascuali[1]; Leopoldina Scotti[1]; Javier Higuera[1]; Ignacio De Zuñiga[2]; Maríana Di Pietro[1]; Marta Tesone[13]; Griselda Irusta[1]; Dalhia Abramovich[1]; Fernanda Parborell[1]
IBYME[1] PREGNA Medicina Reproductiva, Buenos Aires, Argentina.[2] Depto. de Química Biológica, Facultad de Cs. Exactas y Naturales, UBA, Argentina.[3]

La *falla ovárica prematura* (POF) se caracteriza por la desaparición de los folículos ováricos en mujeres jóvenes y una de sus causas puede ser la quimioterapia. Los tratamientos para POF no son totalmente efectivos y consisten de terapias hormonales. En este trabajo se proponen 2 estrategias para proteger al ovario y restaurar la fertilidad en pacientes con cáncer bajo quimioterapia: 1) Administración local de la ceramida-1 fosfato (C1P) y 2) Aplicación local del láser de baja intensidad (LBI). Los objetivos fueron: a) evaluar el efecto *in vivo* del LBI en ovarios de *ratona adulta* sobre la dinámica folicular, b) evaluar el efecto *in vitro* del LBI sobre un *cultivo de célula de granulosa de rata* sobre proliferación y expresión de VEGF, c) evaluar el efecto *in vivo* del C1P o LBI en el *modelo de POF en ratón inducido por quimioterapia* sobre la foliculogénesis, la expresión de hormona Anti-Mülleriana (AMH) y la angiogénesis ovárica. Para el objetivo a), se utilizaron ratonas de 8 semanas (F1 de BalbC x C57/BL6) y se aplicó el LBI (4 y 8 Joules). Para el objetivo b), se realizó un cultivo de células de granulosa (CG) de rata (Sprague-Dawley; 21-23días) y se aplicó LBI (1-10 J). Para el objetivo c), se desarrolló el modelo POF inducido con ciclofosfamida (CTX) en ratonas F1 y se inyectó C1P (5ul/ovario; 0,5-0,6 mM) o se aplicó el LBI (8 J/ovario). En ratonas adultas, el LBI (4 y 8 J) aumentó la reserva ovárica comparada al control. El LBI (8 J) indujo proliferación y expresión de VEGF en CG. El LBI (8 J) y el C1P (0,5-0,6 mM) aumentaron el% de F. primordiales, primarios y preantrales, y disminuyeron el% de F. atrésicos en el modelo POF comparado al grupo POF sin tratar. Ambos tratamientos aumentaron la expresión de AMH. El C1P incrementó la angiogénesis ovárica en el grupo POF comparado al grupo POF sin tratar. En conclusión, tanto el LBI como el C1P mejoran la dinámica folicular en los primeros estadíos y, por ende, preservan la reserva ovárica en la POF inducida con CTX.

(285) LA MUCINA 4, INDUCIDA POR TNFα, MEDIA LA RESISTENCIA AL TRASTUZUMAB Y ESTÁ ASOCIADA A MAL PRONÓSTICO EN CÁNCER DE MAMA HER2 POSITIVO

María Florencia Mercogliano[1]; Mara De Martino[1]; Leandro Venturutti[1]; Martín Alfredo Rivas[2]; Gloria Inurrigarro[3]; Cecilia Jazmín Proietti[1]; Isabel Frahm[3]; Daniel Allemand[4]; Ernesto Gil Deza[5]; Sandra Ares[5]; Gercovich Felipe Gustavo[5]; Patricia Virginia Elizalde[1]; Roxana Schillaci[1]
IBYME[1] Cornell Medical College[2] Servicio de Patología, Sanatorio Mater Dei[3] Hospital Juan A. Fernández[4] Instituto Oncológico Henry Moore[5]

El HER2 es un receptor tirosina quinasa que se encuentra sobreexpresado/amplificado en el ~20% de los cánceres de mama

(CM) invasores. Estos se denominan CM HER2 positivos (HER2+) y están asociados con mal pronóstico. Estos pacientes reciben trastuzumab (T), un anticuerpo monoclonal anti-HER2, pero sólo el 40-60% de ellos responden, por fenómenos de resistencia de novo o adquirida. Previamente demostramos que la estimulación de células de CM HER2+ con el factor de necrosis tumoral alfa (TNF) induce resistencia *in vitro* a los efectos antiproliferativos del trastuzumab. En este trabajo demostramos que la sobreexpresión de TNF en líneas celulares sensibles al T produce resistencia a dicho anticuerpo *in vivo* e *in vitro*. Probamos en dos modelos de resistencia *de novo* al T, que la administración simultánea de T con etanercept (E, anticuerpo bloqueante de TNF) sensibiliza los tumores a la terapia, causando la inhibición de su crecimiento. Comprobamos que el TNF, a través del factor de transcripción NF-κB, aumenta la expresión de la glicoproteína mucina 4 (MUC), enmascarando el epitope reconocido por T en el HER2. Exploramos la utilización de TNF y MUC como biomarcadores de respuesta a T en 75 pacientes con CM HER2+, cuyos tumores fueron obtenidos previo al tratamiento en adyuvancia con T. Evaluamos por inmunohistoquímica (IHQ) la expresión de MUC y TNF, resultando positiva en 88% y 57% de los CM, respectivamente. Encontramos una correlación positiva entre la expresión de MUC y TNF (p=0,025), y entre la expresión de MUC y una menor sobrevida libre de enfermedad (p=0,020). Asimismo, comprobamos que MUC es un marcador independiente de recaída (p=0,009). Estos resultados sugieren que la determinación de MUC en pacientes con CM HER2+ puede utilizarse como marcador de respuesta a T. Más aun, proponemos que los pacientes con CM MUC positivos podrían beneficiarse del tratamiento combinado de T con un bloqueante del TNF, como el E, para prevenir o revertir la resistencia a T.

(431) EL FENÓMENO DE RESISTENCIA CONCOMITANTE EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA HUMANO: UN POSIBLE FRENO PARA LA METASTASIS

Geraldine Güeron[1]; Nicolas Anselmino[1]; Paula Chiarella[2]; Alejandra Paez[1]; Emiliano Ortiz[1]; Vernica Manzano[3]; Federico Schuster[1]; Jimena Giudice[4]; Daiana Leonardi[1]; Felipe Jaworsky[1]; Javier Cotignola[1]; Roberto Meiss[4]; Norma Daccorso[3]; Raul Ruggiero[2]; Elba Vazquez[1]
DPTO. QUÍMICA BIOLÓGICA, FCEYN, UBA- IQUIBICEN, CONICET[1] Laboratorio Oncología Experimental, IMEX-CONICET[2] Departamento de Química Orgánica, FCEN-UBA CIHIDECAR-CONICET-UBA[3] Baylor College of Medicine, Houston, Tx, USA[4]

El cáncer de próstata (PCa) es la segunda causa de muerte por cáncer en los hombres occidentales. La ablación de andrógenos es la terapia más efectiva, pero en algunos casos la enfermedad se convierte en resistente a la castración. La resistencia concomitante antitumoral (RC) es el fenómeno según el cual un individuo portador de un tumor inhibe o retarda el crecimiento de un implante tumoral secundario. En este trabajo demostramos por primera vez que el fenómeno de RC se da en modelos experimentales de tumores sólidos humanos. Ratones atímicos fueron inoculados s.c. en el flanco derecho con células PC3 (1 x 10^6, implante primario). Luego de 14 días los animales recibieron una segunda inoculación en el flanco izquierdo (1 x 10^6, implante secundario). Los controles solo recibieron el implante secundario. El crecimiento del implante secundario se redujo significativamente (92%; P<0,05) en animales que también portaban el implante primario. Más aún, detectamos la presencia de *m*-tyr (un isómero no-natural de la tirosina) en los sueros de los ratones portadores de tumor. El fenómeno de RC fue revertido en presencia de L- fenilalanina (Phe), precursor de la tirosina. In vitro *m*-tyr disminuyó la viabilidad celular e indujo arresto del ciclo celular, efectos revertidos en presencia de Phe. Además, *m*-tyr inhibió las metástasis experimentales de pulmón provocadas por inoculación de células PC3 en ratones atímicos (P < 0,05). Este efecto inhibitorio se confirmó en otros dos modelos murinos de metástasis espontáneas de carcinomas mamarios. En resumen, por primera vez demostramos que RC se dispara en modelos experimentales de tumores sólidos humanos, que este fenómeno es mediado *m*-tyr. Dilucidamos parte del mecanismo molecular por el cual la *m*-tyr ejerce su rol anti-tumoral. Por último demostramos el fuerte rol supresor de *m*-tyr en las metástasis experimentales. Estos resultados pueden ofrecer una alternativa terapéutica promisoria en el manejo de los cánceres metastásicos.

(556) LA VÍA DE PI3K/AKT, A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DE LAS ISOFORMAS AKT1 O AKT2, REGULA DIFERENCIALMENTE LA PROLIFERACIÓN Y LA MIGRACIÓN CELULAR EN CÁNCER DE MAMA

Marina Riggio[1]; María Cecilia Perrone[1]; María Laura Polo[1]; María May[1]; Ana Sahores[1]; María Jimena Rodríguez[1]; Diego Lucas Kaen[2]; Claudia Lanari[1]; Virginia Novaro[1] I
BYME[1] CORI[2]

PI3K/Akt es la vía más comúnmente mutada en tumores sólidos; alrededor del 70% de los tumores de mama presentan alguna mutación en esta vía y su activación se asocia con resistencia a terapias. Existen tres isoformas para Akt: Akt1, Akt2 y Akt3, con discrepancias sobre sus funciones específicas. Previamente demostramos que Akt1 induce el crecimiento hormono-independiente de tumores mamarios, por activación de la proteína ribosomal S6, y fosforilación de receptores hormonales en ausencia de ligando. El objetivo de este trabajo fue estudiar el rol diferencial de Akt1 y Akt2 en la progresión tumoral en dos líneas humanas de cáncer de mama, IBH-6 y T47D, y en muestras de pacientes. En las líneas celulares sobreexpresamos o inhibimos específicamente cada isoforma y analizamos el fenotipo tumoral obtenido. El silenciamiento de Akt1 disminuyó la proliferación e incrementó la migración e invasión celular *in vitro* a través del eje b1-integrina/FAK/MMP9. El silenciamiento de Akt2 disminuyó la motilidad celular regulando proteínas del citoesqueleto como Vimentina y F-actina. Coincidentemente, en xenotransplantes el silenciamiento de Akt1 produjo una disminución del crecimiento tumoral, pero los tumores resultaron altamente infiltrantes. La sobreexpresión de Akt2 también indujo tumores con características infiltrantes pero sin modificar el crecimiento tumoral. El grado de invasión de los tumores con distintos niveles de Akt1 y Akt2 se asoció con la expresión de E-cadherina y Vimentina, marcadores de progresión tumoral. En biopsias de tumores de mama con distinto subtipo histológico encontramos una asociación entre la expresión de Akt2, el grado de invasión tumoral y la pérdida de E-cadherina. Estos resultados demuestran que tanto la expresión de Akt2 como la inhibición de Akt1 juegan un rol relevante en la adquisición del fenotipo invasivo. El estudio de cada isoforma y de sus proteínas *target* sería fundamental en el diseño de terapias dirigidas a cada tipo y estadío tumoral.

(641) GALECTINA-8 ES EXPRESADA DESDE ESTADIOS NEOPLÁSICOS CONTROLANDO LA PROGRESIÓN METASTÁSICA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

Lucas Daniel Gentilini[1]; Ignacio González Pérez[1]; Felipe Martin Jaworski[1]; Laura Giribaldi[1]; Mónica Lidia Kotler[2]; Anne Chauchereau[3]; Diego Jose Laderach[1]; Daniel Compagno[1]
Lab. de Glico-oncología Molecular y Funcional - IQUIBICEN-Depto. de Química Biológica- FCEyN - UBA[1] Lab. de Apoptosis en el Sistema Nervioso y Nano-oncología - IQUIBICEN - Depto. de QB- FCEyN - UBA[2] Institut Gustave Roussy-INSERM U981, Villejuif, France[3]

El cáncer de próstata (CaP) es un problema importante de salud a nivel mundial por ser el segundo tipo de cáncer en hombres (IARC, WHO). Entre un 15 y 20% de los pacientes evolucionan hacia fases avanzadas metastásicas para las que no hay tratamientos eficaces, por lo que se requieren métodos alternativos de prevención de la metástasis. Galectina-8 (Gal-8) solo se expresa en estadios neoplásicos prostáticos. El objetivo de este trabajo es investigar el rol de Gal-8 en el desarrollo del CaP. Para ello silenciamos Gal-8 en la línea de CaP humana IGR-CaP1 mediante shARN específico (líneas IGR-CaP1 shGal-8 e IGR-CaP1 shCtrl, secuencia control) y generamos un modelo experimental preclínico de CaP para estudiar la patología hasta etapas tardías de metástasis a ganglios linfoides (GL). Por primera vez, demos-

tramos que Gal-8 es responsable de la evolución metastásica del CaP, ya que al silenciar su expresión se inhibió completamente el desarrollo de metástasis a GL, que fue del 100% con las células shCtrl. Al analizar aspectos celulares asociados a la metástasis, no encontramos diferencias en la proliferación, clonogenicidad o en la interacción con células endoteliales al silenciar Gal-8, pero si disminuyó la capacidad migratoria ($p<0,005$), que se correspondió con un menor número de filopodios por células ($p<0,005$). La agregación homotipica celular también disminuyó al silenciar Gal-8 ($p<0,01$). Al estudiar la resistencia a la anoikis como la proporción de células en subG1/G0, encontramos el 35,5% de células shGal-8 en dicha etapa, mientras que en las células control fue del 4,1 y 3,5% (*wild type* y shCtrl, respectivamente), que se corroboró en un aumento de caspasa-3 activa y PARP clivado ($p<0,05$). Como E-caderina interviene en la agregación homotipica, medimos su expresión y hayamos una disminución de 10 veces al silenciar Gal-8. En conclusión, estos resultados proponen a Gal-8 como potencial blanco terapéutico para tratamientos contra la metástasis del CaP.

(40) LA PROTEÍNA CTBP1 Y EL SÍNDROME METABÓLICO SON REGULADORES CLAVE DE LA CARCINOGÉNESIS Y EL DESARROLLO TUMORAL MAMARIO

Paola De Luca[1]; Nicols Dalton[1]; Georgina Scalise[1]; Cristian Moiola[5]; Juliana Porretti[1]; Cintia Massillo[1]; Florencia Zalazar[1]; Carolina Flumian[2]; Laura Todaro[2]; Elba Susana Vazquez[3]; Roberto Meiss[4]; Adriana De Siervi[1]

Laboratorio de Oncología Molecular y Nuevos Blancos Terapéuticos - IByME - CONICET[1] Instituto de Oncología Angel H. Roffo - UBA[2] Laboratorio de Inflamación y Cáncer - Dpto de Química Biológica - FCEN- UBA - IQUIBICEN - CONICET[3] Academia Nacional de Medicina[4] IBYME - CONICET[5]

El síndrome metabólico (SM) aumenta la incidencia y agresividad del cáncer de mama. C-terminal binding protein 1 (CtBP1) es un correpresor de genes supresores tumorales que se activa por NADH/NAD+. En este trabajo nuestro objetivo fue estudiar el efecto de la hiperactivación de CtBP1 por la administración de una dieta con alta energía sobre la carcinogénesis maMaría y el desarrollo tumoral en un modelo murino. Para ello, desarrollamos un modelo de SM en ratones hembras *nu/nu*, por alimentación crónica con dieta control (5% grasa) o dieta grasa (37% grasa). Encontramos que la dieta grasa indujo en los animales alteraciones consistentes con la aparición de un SM. Utilizando este modelo demostramos que el SM aumentó el desarrollo postnatal de la glándula maMaría observándose un ligero aumento en la expresión de CtBP1 en los conductos mamarios, sugiriendo que CtBP1 podría ser el nexo molecular entre el SM y la carcinogénesis maMaría. Asimismo, el SM modula la capacidad de autorrenovación celular ya que indujo la expansión de la población de células progenitoras en células tumorales maMarías LM38-LP. CtBP1 aumentó la proliferación de células tumorales maMarías MDA-MB-231 inhibiendo el arresto del ciclo celular. Más aún, CtBP1 aumentó el crecimiento tumoral de xenotransplantes derivados de MDA-MB-231 en ratones con SM regulando genes involucrados en proliferación, autorrenovación, transición epitelio-mesenquimal y el desarrollo mamario. Finalmente, utilizando microarreglos de expresión de miRNAs, identificamos 42 miRNAs involucrados en procesos metabólicos, de proliferación y comunicación celular regulados por CtBP1 en tumores desarrollados en animales con SM. Nuestros resultados identifican por primera vez a CtBP1 como un gen que conecta el SM con la carcinogénesis y el desarrollo tumoral mamario. Estos hallazgos proveerán nuevas herramientas para el diagnóstico, seguimiento y desarrollo de nuevas terapias para esta enfermedad.

(153) EFECTOS DEL IMPLANTE DE CÉLULAS MESENQUIMALES ALOGÉNICAS MODIFICADAS PARA SOBREEXPRESAR HIF1-α NO DEGRADABLE SOBRE EL TAMAÑO DE INFARTO Y LA FUNCIÓN VENTRICULAR EN UN MODELO OVINO DE INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO

Anna Pavlovna Hnatiuk; Fernanda Daniela Olea; Paola Locatelli; Andrea De Lorenzi; Carlos Sebastían Giménez; Rubén Laguens; Alberto Crottogini

Universidad Favaloro

Introducción: Las células mesenquimales de médula ósea (CMMO) tienen efecto cardioprotector en el infarto agudo de miocardio (IAM) por acción parácrina de factores angiogénicos que secretan. Por otro lado, la subunidad α (degradable en normoxia) del factor inducible por hipoxia 1 (HIF1) es indispensable para la actividad de este factor de transcripción de genes de reparación tisular y anti-isquémicos. Hipotetizamos que la inyección intramiocárdica de CMMO que sobreexpresen HIF1-α mutado (resistente a normoxia) disminuiría el tamaño de infarto (TI) y mejoraría la función ventricular (FV) más que las CMMO sin transfectar. Métodos y resultados: Ovejas con ligadura coronaria recibieron en el peri-IAM CMMO transfectadas con minicírculo codificante para HIF1-α mutado (CMMO-HIF, n=6), CMMO (n=6), o PBS (Placebo, n=6). A 60 días (d) post-IAM, el TI (resonancia magnética cardíaca, RMC) se redujo 44±12% en CMMO ($p<0,001$) y 72±3% en CMMO-HIF ($p<0,001$) con respecto al tamaño inicial (X±DS, ANOVA-Bonferroni) pero no en Placebo. La fracción de eyección% aumentó de 27,2±6,5 post-IAM a 53,4±5 a 60 d en CMMO-HIF y de 27,2 a 36,6 en CMMO ($p<0,01$ vs. CMMO-HIF), pero no cambió en Placebo. En ovejas adicionales a 7 y 60 d post-implante se halló (RT-qPCR) sobreexpresión de HIF1-α y de genes "río abajo" de HIF (EPO, angiopoietina 1, VEGF y óxido nítrico sintasa inducible). La densidad arteriolar y capilar (inmunohistoquímica, IHQ) fueron mayores en CMMO-HIF ($p<0,01$ vs. CMMO y placebo), así como el número de miocardiocitos en ciclo celular (IHQ anti-Ki67). Marcando las células con óxido de hierro super-paramagnético se constató (mediante detección de zonas hipointensas en la RMC) mayor retención miocárdica de las CMMO-HIF que de las CMMO a los 60 d post-implante ($p<0,001$). Conclusión: Las CMMO que sobreexpresan HIF1-α no degradable reducen el TI y mejoran la FV, debido a angiogénesis y cardiomiogénesis inducidas por sobreexpresión de factores cardioptotectores trascriptos por HIF1.

PREMIO PATRICIO COSSIO A INVESTIGACIÓN CLÍNICA

(184) ESTEROIDES NEUROACTIVOS: SU RELACIÓN CON LA CLÍNICA NEUROLÓGICA Y EL ESTADO COGNITIVO EN PACIENTES ADULTOS CON ACCIDENTE CEREBROVASCULAR ISQUÉMICO AGUDO

Sebastián Marcelo Casas[1]; Marcelo Mattiazzi[1]; Gisella Gargiulo-Monachelli[2]; Mara Claudia Gonzalez Deniselle[2]; Alejandro Federico De Nicola[2]

Hospital Militar Central Cirujano Mayor Dr. Cosme Argerich[1] Instituto Biología y Medicina Experimental (IBYME) - CONICET[2]

Introduccion y Objetivos: El accidente cerebrovascular isquémico (ACVi) es la primera causa de invalidez permanente y no existe un tratamiento médico efectivo que revierta esta alteración. Los esteroides neuroactivos son moléculas derivadas del colesterol que modulan la funcionalidad del sistema nervioso. El objetivo fue estudiar si el ACVi agudo afecta las concentraciones séricas del Estradiol (E2), Testosterona (T), Androstenediol Glucuronido 3-alfa(AG), Progesterona (P4) y Cortisol (C) y su relación con la clínica neurológica y el estado cognitivo en pacientes adultos. Material y Método: Diseñamos dos grupos experimentales con 30 pacientes cada uno de ellos (15 hombres y 15 mujeres): (1) grupo control y (2) grupo ACVi agudo. El dosaje de E2 y P4 se realizó por ECLIA y la determinación de T, AG y C por MEIA. La cuantificación del déficit neurológico fue por la escala del NIHSS y el estado cognitivo fue evaluado por 2 pruebas psicométricas breves. Este protocolo fue aprobado por el Comité Institucional de Revisión de Ensayos Clínicos. Resultados: El déficit neurológico fue mayor en las mujeres respecto a los hombres ($p<0.05$). El estado cognitivo de las mujeres luego del ACVi fue menor respecto al grupo control ($p<0.001$). El ACVi indujo un aumento significativo en las concentraciones de E2 en mujeres y hombres

respecto al grupo control mujeres (p<0.01 y p<0.001). Además el ACVi produjo un incremento significativo en las concentraciones de C en ambos sexos respecto al grupo control (mujeres y hombres) (p<0.001 y p<0.05). No se observaron cambios en T, AG ni en P4. Conclusion: Los niveles de esteroides neuroactivos están sujetos a cambios dinámicos producidos por variadas condiciones fisiológicas y patológicas. El organismo responde ante el daño isquémico cerebral con cambios de la esteroidogénesis evidenciados por una mayor concentración plasmática de los esteroides E2 y C los cuales podrían neuromodular el área de lesión y penumbra neuroglial.

(238) TEJIDO ADIPOSO EPICÁRDICO Y SU ROL EN LA PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD CORONARIA

Veronica Miksztowicz[12]; Morales Celina[3]; Barchuk Magalí[1]; Lopez Graciela[1]; Gelpi Ricardo[23]; Schreier Laura[1]; Rubio Miguel[4]; Berg Gabriela[12]

Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis, Departamento de Bioquímica Clinica, Facultad de Farmacia y Bioquímica – INFIBIOC, Universidad de Buenos Aires[1] Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)[2] Instituto de Fisiopatología Cardiovascular y Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UBA[3] División de Cirugía Cardíaca del Hospital de Clínicas José de San Martín, UBA[4]

La expansión del tejido adiposo epicárdico (TAE), tejido adiposo visceral ubicado sobre el miocardio y alrededor de las arterias coronarias, se propone como nuevo factor de riesgo independiente de enfermedad coronaria (EC). Estudios sugieren que las metaloproteasas (MMPs) contribuirían al remodelamiento del TA mediante la degradación de la matriz extracelular o la activación de factores de crecimiento involucrados en el proceso de angiogénesis. Objetivos**:** evaluar el comportamiento de MMP-2 y -9 y marcadores de angiogénesis en TAE de pacientes con EC. Sujetos y métodos: se obtuvo TAE y TA subcutáneo (TAS) de pacientes con EC (n=30) sometidos a cirugía de revascularización y pacientes derivados a cirugía cardiovascular no coronaria (No EC, n=18), en el momento de la cirugía. Se evaluó localización y actividad de MMP-2 y -9, niveles del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), densidad vascular (DV) y presencia de células inflamatorias. Resultados: MMP-2 y -9 se localizaron en el estroma conectivo perivascular y en la membrana basal de los adipocitos. La actividad de ambas gelatinasas se encontró aumentada en TAE de EC, respecto a No EC (MMP-2: 1.60±0.52 vs 1.31±0.26 UR, p=0.041; MMP-9: 1.46±0.48 vs 1.18±0.22 UR, p=0.027). En EC, TAE presentó mayor actividad de MMP-2 (1.60±0.52 vs 1.23±0.36 UR, p=0.005) y -9 (1.46±0.48 vs 1.17±0.24 UR, p=0.048) que TAS. La actividad de MMP-2 se asoció con los niveles de VEGF (r=0.649, p=0.016). La DV fue significativamente mayor en TAE de EC respecto a No EC (p=0.015); en EC, TAE presentó mayor DV que TAS (p=0.014). MMP-2 y -9 se asociaron con la DV en TAE (r=0.694, p=0.006 y r=0.634, p=0.02 respectivamente). En TAE de EC se observó mayor infiltrado de linfocitos T y macrófagos que en TAS. Conclusión: en pacientes con EC, el aumento en la actividad de MMP-2 y -9 en el TAE, acompañado de un ambiente pro-inflamatorio, favorecería la expansión del tejido aumentando el riesgo cardiovascular.

(369) LAS ISOFORMAS DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA COMO MARCADOR PRONÓSTICO DEL RIESGO DE RECURRENCIA EN CÁNCER DE MAMA

María May[1]; Martin Abba[2]; Paola Rojas[1]; Gonzalo Sequeira[1]; Andrés Elia[1]; Michelle Alvarez[1]; Alfredo Molinolo[3]; Stephen Hewitt[4]; Charles Perou[5]; Paula Martinez[6]; Pedro Gonzalez[6]; Hugo Gass[6]; Claudia Lanari[1]

IBYME[1] UNL, La Plata[2] UCSD, la Jolla, California[3] NIH, Bethesda[4] UNC, Chappel Hill[5] Hospital María V. de Martinez, Gral. Pacheco[6]

El receptor de progesterona (RP) se utiliza como marcador de la funcionalidad del receptor de estrógenos. Existen dos isoformas del RP; RPA (94kDa) carece de los primeros 164 aminoácidos del extremo N- terminal de RPB (115kDa). Hemos demostrado que la proporción de isoformas de RP determina la respuesta a antiprogestágenos en cáncer de mama, sólo en aquellos tumores con mayor expresión de RPA que RPB (tumores RPA+). El objetivo del estudio fue estudiar en ambos tipos de tumores la expresión génica diferencial y los parámetros clínico patológicos. Se identificaron 140 genes que surgen de la comparación de 14 carcinomas mamarios de histología ductal analizados por RNA-Seq con el algoritmo EBseq (FC > ±2; FDR < 0.05); 55 genes fueron regulados positivamente en los tumores RPA (+), y 85 en los RPB (+). Tres de ellos fueron seleccionados en función de su significancia estadística y biológica para su posterior validación. Se analizaron los datos utilizando el PAM50 para predecir el riesgo de recurrencia, y la mayoría de los genes relacionados a proliferación se encontraron aumentados en las muestras RPB+, siendo estas mismas pacientes categorizadas como de alto riesgo. De los 103 pacientes RP+ estudiados hasta el momento se observó una asociación de parámetros clínicos de significancia pronóstica como edad al diagnóstico, tamaño tumoral y% de recurrencia a los pacientes RPB+. Todo indicaría que las RPB+ conllevan un peor pronóstico a pesar de que aún las diferencias halladas no son significativas. Asimismo se observaron más casos con expresión de HER-2 en los RPB+ que en los RPA+ (p=0.06). Adicionalmente, hallamos una correlación negativa entre el valor de Ki-67 y la proporción de RPA/RPB (p< 0.0029) apoyando los datos anteriores y sugiriendo que los tumores RPB+ son más proliferativos. En conjunto estos resultados proponen que la evaluación de isoformas de RP no sólo sería necesaria para predecir la sensibilidad al tratamiento con antiprogestágenos sino que además tendrían un valor pronóstico.

(86) PREDICCIÓN DE LA DOSIS DE ACENOCUMAROL A TRAVÉS DE UN MODELO DE REGRESIÓN LINEAL MÚLTIPLE

Carolina Vazquez[1];María Orlova[1]; Paula Scibona[1]; Jorge A. Arbelbide[2]; Maríana R. Ambrosis[3]; Victoria Otero[2]; Leandro Kovalevski[4]; Ventura A. Simonovich[1]; Waldo H. Belloso[1]

Farmacologia Clinica. Hospital Italiano de Buenos Aires[1] Hematologia Clinica. Hospital Italiano de Buenos Aires[2] ICBME. Hospital Italiano de Buenos Aires[3] Escuela de Estadística, Fcecon, UNE[4]

Introducción: los anticoagulantes orales (ACO) requieren control estricto de la dosis a través de la Razón Internacional Normalizada (RIN). Hay evidencia para el uso de análisis farmacogenético (FG) en la adecuación de la dosis inicial de warfarina pero no así de acenocumarol. Objetivo: Evaluar el impacto de parámetros FG en la dosis estable de acenocumarol y desarrollar un modelo de predicción de dosis. Métodos: Estudio de corte transversal. Se incluyeron pacientes (ptes) con dosis estable de acenocumarol (>=3 RIN en rango). Se realizó genotipificación para CYP2C9 (1/1 normal, 1/2 y 1/3 intermedia, 2/3 y 2/2 y 3/3 baja expresión) y VKORC-1 (haplotipo A > susceptibilidad a ACO, haplotipo No A normal) por técnicas de PCR/RFLP. Las variables candidatas se incluyeron en modelo de regresión lineal múltiple. Resultados: 81 ptes incluidos; edad: 71,67 (± 11,69), hombres: 42 (51,1%), peso: 78,37 (± 16,23), amiodarona: 14 (17,3%). La dosis media general de acenocumarol fue 12,13 (± 7,02), y según VKORC-1 para haplotipo no A: 13,16 mg/sem (IC 95%: 11,49 - 14,82), haplotipo A: 6,76 mg/sem (IC 95%: 4,92 - 8,6), (*p< 0,01*). Segun CYP2C9, la dosis media para el grupo de genotipos 1/1, 1/2, 1/3 fué 12,31 mg/sem (IC 95%: 10,73 - 13,89); y de 8,12 mg/sem (IC95%: 5,6 - 10,64) para los genotipos 2/3, 2/2, 3/3 (*p: 0,035*). En el subgrupo de ptes con amiodarona, la mediana de dosis de acenocumarol en mg/sem fue de 4.75 (IQ:0.5) para haplotipo A y de 12,5 (IQ:8,5) para haplotipo no A del VKORC-1 (*p:0,04*). En el modelo de regresión lineal múltiple fueron incluidos el haplotipo de VKORC-1 (*p<0,01*) y la edad (*p< 0,01*). Conclusiones: Existe una fuerte asociación entre el haplotipo de VKOR-C y la edad en la dosis media de acenocumarol. Se requieren más ptes para valorar el rol de otras variables candidatas como la amiodarona y el CYP2C9.

(96) LA EXPRESIÓN DEL GEN DMD SE ENCUENTRA ALTERADA EN TUMORES DE TEJIDOS NO MIOGÉNICOS

Javier Cotignola[1]; Leonela N Luce[2]; Mercedes Abbate[1]; Florencia Giliberto[2]
IQUIBICEN, CONICET / Dpto. Química biológica, FCEN, UBA[1] INIGEM, CONICET / Cátedra de genética y biología molecular, FFYB, UBA[2]

Las mutaciones en el gen DMD se asocian con el desarrollo de Distrofinopatías (Distrofia muscular de Duchenne/Becker y Cardiomiopatía dilatada ligada al cromosoma X), una de las enfermedades genéticas más frecuentes. Este gen tiene 2.4 Mb y codifica, al menos, 15 isoformas tejido específicas de la proteína Distrofina. Sin embargo, hasta ahora, la función de la Distrofina de músculo esquelético es la que mejor se ha logrado caracterizar. Recientemente, se ha reportado que el gen DMD se asocia también con el desarrollo, progresión y malignización de tumores miogénicos, asignándole una función de supresor tumoral. Por ello, el objetivo del presente estudio fue analizar la expresión del gen DMD en distintos tipos de tumores no miogénicos. Utilizamos resultados de microarrays de expresión publicados en la base de datos pública GEO (Gene Expression Omnibus) del NCBI. Se analizaron los perfiles de expresión diferencial del gen DMD en distintos tipos tumorales no miogénicos (melanoma, carcinoma próstatico, carcinoma pulmonar, cáncer de mama, carcinoma pancreático, cáncer de colon, tumores cerebrales, leucemias y carcinoma renal) comparando con sus contrapartes normales. Se encontró significativamente disminuída la expresión de DMD en 16/28 (57%) de las comparaciones realizadas (Fold-Change (FC) $\leq$ 0.70; rango del p-valor = $0.035\text{-}1.09\text{x}10^{-20}$). Interesantemente, se halló significativamente incrementada la expresión en leucemias y en carcinoma renal. Además, el análisis de muestras pareadas (muestra normal y tumoral procedente del mismo paciente) mostró disminución de la expresión en la mayoría de los tumores comparada a la contraparte normal. Estos resultados apoyan el rol de la Distrofina como supresor tumoral en la mayoría de los tumores no miogénicos. Esta nueva función liga al gen DMD con una de las enfermedades más frecuentes como el cáncer. El estudio de la expresión de DMD podría utilizarse como biomarcador pronóstico de los tumores.

PREMIO FUNDACIÓN GADOR EN NEUROCIENCIAS

(508) ELUCIDACIÓN DEL MECANISMO MOLECULAR POR EL CUAL EL TRATAMIENTO CON GALECTINA-1 PRODUCE REGENERACIÓN NEURONAL EN LESIONES DE MÉDULA ESPINAL

Hector Ramiro Quinta[1]; Carlos Wilson[3]; Ada Blidner[2]; Christian Gonzales-Billault[3]; Laura Andrea Pasquini[1]; Gabriel Adrian Rabinovich[2]; Juana María Pasquini[1]
IQUIFIB[1] IBYME[2] universidad de Chile[3]

Al producirse una lesión de médula espinal un sinnúmero de proteínas inhibidoras de la regeneración axonal invaden el sitio de lesión. La Semaforina3A (Sema3A) es la primera en alcanzarlo, siendo además la de mayor potencial inhibitorio. La unión de Sema3A al complejo-receptor Neuropilina-1/PlexinA4 (NRP-1/PlexinA4) presente en las neuronas lesionadas, gatilla una señalización intracelular que evita que se produzca la regeneración axonal y la recuperación locomotora. Por lo tanto, el desafío es encontrar una terapia que bloquee eficientemente dicho mecanismo. Hemos demostrado que la aplicación de la proteína Galectina-1 (Gal-1) en el sitio de lesión de ratones totalmente paralíticos produce regeneración axonal y una consecuente recuperación locomotora. Sin embargo, se desconoce el mecanismo molecular por el cual Gal-1 promueve dicho efecto, el cual es necesario conocer con el objeto de su utilización como posible tratamiento en la clínica médica. Por lo tanto en este trabajo demostramos que la inhibición de la regeneración axonal se debe a un incremento intra-neuronal de peróxido de hidrogeno gatillado por Sema3A, el cual oxida a la actina filamentosa presente en los axones, transformándola en monómero, y haciendo colapsar el cono de crecimiento axonal. Solo el tratamiento con Gal-1 en conformación dimérica y con sus sitios de reconocimiento a carbohidratos intactos, logró disminuir los niveles de peróxido de hidrogeno producidos previamente, reactivando el citoesqueleto de actina y evitando de esa manera el colapso axonal. Todo el proceso ocurre en forma secuencial, ya que primero la Galectina-1 adicionada es captada por los receptores NRP-1/PlexinA4 (presente en la superficie de las neuronas lesionadas) a través de una interacción N-glicano compleja, luego la Galectina-1 se internaliza junto con la PlexinA4, desplazándose retrógradamente a lo largo del axón a medida que el nivel de peróxido de hidrogeno va disminuyendo y la actina se re-polimeriza en el cono de crecimiento axonal. En resumen, este mecanismo explicaría la significativa regeneración del tracto cortico espinal (principal tracto motor) y finalmente la recuperación locomotora.

(548) LA EXPOSICIÓN A AMBIENTE ENRIQUECIDO COMO ESTRATEGIA NEUROPTOTECTORA FRENTE A LA AXONOPATÍA DISTAL TEMPRANA DE LA VÍA VISUAL EN LA DIABETES EXPERIMENTAL

Damian Dorfman; Marcos L. Aranda; María F. Gonzalez Fleitas; Hernan H. Dieguez; María I. Keller Sarmiento; Monica S. Chianelli; Pablo H. Sande; Ruth E. Rosenstein
Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Facultad de Medicina, UBA, CEFYBO/CONICET

La retinopatía diabética (RD) es una de las principales causas de ceguera. Alteraciones en la porción distal del nervio óptico (NO) podrían constituir el primer cambio estructural en el sistema visual inducido por diabetes. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto neuroprotector de la exposición a ambiente enriquecido (AE) sobre el NO frente al daño temprano inducido por diabetes experimental. Ratas *Wistar* macho adultas recibieron una única inyección de estreptozotocina (60 mg/kg) o vehículo. Los animales control o diabéticos (una vez confirmada la hiperglucemia) se albergaron en ambiente estándar (AS) o AE durante 6 semanas. El AE consistió en jaulas grandes conteniendo 6 animales/jaula, ruedas y diferentes objetos que se reposicionaron 1 vez/día y se sustituyeron completamente 1 vez/semana. El AS consistió en jaulas estándar de laboratorio que albergaron 2 animales/jaula. Se evaluó el transporte anterógrado hacia el colículo superior (inyección intravítrea de toxina colérica, CTB) y las alteraciones morfológicas en la región proximal y distal del NO. En animales diabéticos albergados en AS, se observó un déficit marcado en la comunicación retino-colicular, un aumento en la reactividad macro y microglial, una disminución significativa en el número de axones ($p<0.01$), alteraciones en la estructura axonal (evaluada por inmunorreactividad para la cadena pesada fosforilada del neurofilamento), alteraciones en la compactación de la mielina (evaluada por microscopía electrónica) y una disminución en la inmunorreactividad para el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF) exclusivamente en la porción distal del NO. La exposición a AE, que no indujo cambios en animales no diabéticos, previno significativamente ($p<0.01$) todas estas alteraciones. Estos resultados sugieren que la exposición a AE podría ser una estrategia eficaz y no invasiva para prevenir las alteraciones axo-gliales en la porción distal del NO inducidas por diabetes.

(603) LA EXPOSICIÓN TEMPRANA A UNA DIETA ALTA EN GRASAS PROMUEVE ALTERACIONES EN EL ESTADO COGNITIVO Y EMOCIONAL DE RATONES C57BL/6 EN UN CONTEXTO DE NEUROINFLAMACIÓN HIPOCAMPAL Y NEUROGÉNESIS IMPEDIDA

Angeles Vinuesa[12]; Carlos Javier Pomilio[12]; Laura Garay[1]; Martín Menafra[3]; Fernando Brites[3]; María Marta Bonaventura[1]; Victoria Lux[1]; Juan Beauquis[12]; Flavia Eugenia Saravia[12]
IBYME[1] FAC.DE Cs.Exactas[2] Fac. de Farmacia y Bio-Química[3]

La obesidad, DT2 y síndrome metabólico están entre los principales factores de riesgo de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer's (AD). La resistencia a insulina, inflamación y disfunción cognitiva son comunes tanto en patologías neurode-

generativas como metabólicas. Este trabajo propone estudiar el efecto de la exposición juvenil a una dieta alta en grasas (HFD) en el sistema nervioso central de ratones C57BL/6. La exposición a la dieta HFD produjo dislipidemia, resistencia a insulina e inflamación periférica además de alteraciones en la conducta y parámetros centrales. Los ratones HFD mostraron deterioro cognitivo: deficiencia en la construcción de un nido, impedimento de la memoria espacial a corto y mediano plazo en la prueba de reconocimiento de localización novedosa de un objeto y laberinto en Y respectivamente. Con respecto a la conducta emocional, el desempeño en el laberinto elevado en cruz mostró un fenotipo ansioso en los HFD, y el test de suspensión de cola un comportamiento símil depresivo. Esto correlaciona con la hiperactividad de la amígdala encontrada (más núcleos c-Fos+). Se encontraron alteraciones en la neurogénesis en hipocampo de ratones HFD: proliferación de células Ki67+ disminuida un 29% y 25% menos de neuronas inmaduras (DCX+) en el hipocampo dorsal. Resultados preliminares muestran una menor señalización de insulina en el hipocampo HFD -pAkt disminuido- sugiriendo resistencia a insulina central. En términos de inflamación hipocampal se encontró una mayor densidad de microglia Iba1+ y mayor tamaño de soma de las mismas. En conclusión, nuestros datos indican que la exposición a la dieta HFD en el período juvenil promueve alteraciones metabólicas asociadas con deterioro cognitivo, conducta ansiosa y asociada a depresión, así como neuroinflamación, disminución de la neurogénesis y resistencia a insulina en hipocampo, alteraciones también presentes en AD, motivando a profundizar en la interrelación entre ambas patologías.

PREMIO CAMILIÓN DE HURTADO

(348) LA INHIBICIÓN DE CAMKII PREVIENE LA DISFUNCIÓN CONTRÁCTIL ASOCIADA CON SEPSIS

Marisa Sepúlveda; Gonano Luis; Viotti Manuel; Vila Petroff Martn
Centro de Investigaciones Cardiovasculares Dr. Horacio E. Cingolani, Facultad de Cs. Médicas, UNLP, CCT Conicet La Plata

En sepsis, el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica a la infección severa, existe una reconocida asociación entre disfunción cardiaca y mortalidad. Sin embargo, los mecanismos que subyacen a la disfunción contráctil asociada con sepsis no han sido completamente dilucidados. En el presente estudio examinamos los mecanismos subcelulares involucrados en la disfunción contráctil asociada con sepsis. Usando un modelo experimental de sepsis se denominada CASP (peritonitis provocada por colocación de una cánula en el colon ascendente) y sus controles Sham, observamos que cardiomiocitos CASP tiene significativamente disminuido el acortamiento celular, el transitorio de Ca^{++} y el contenido de Ca^{++} del retículo sarcoplasmático (RS) con respecto a cardiomiocitos Sham. Por otra parte, los corazones CASP tienen aumentada la activación de proteína quinasa II dependiente de calcio y calmodulina (CaMKII) inducida por oxidación (CASP 0,92 ± 0,1 UA, Sham 0,56 ± 0,05 UA). La inhibición farmacológica de CaMKII con 2,5 μM de KN93 previno la disminución de la contractilidad y del transitorio de calcio observada en cardiomiocitos CASP. Resultados similares se obtuvieron en ratones transgénicos que expresan un péptido inhibidor de CaMKII (AC3-I). La disfunción contráctil asociada con sepsis también se previno en ratones mutantes que tiene el sitio de fosforilación del RyR2 específico de CaMKII mutado a alanina y por lo tanto no fosforilable. Los resultados indican que la oxidación y consecuente activación de CaMKII tiene un rol causal en la disfunción contráctil asociada con sepsis. La activación de esta quinasa, a través de la fosforilación del RyR, llevaría a una pérdida de Ca^{++} del RS con la consecuente disminución del transitorio de calcio y de la contractilidad.

(594) SILENCIAMIENTO GÉNICO DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGFR). EVIDENCIA DE INHIBICIÓN FUNCIONAL EN MIOCARDIO

María Soledad Brea; Romina Gisel Díaz; Patricio Eduardo Morgan
Centro de Investigaciones Cardiovasculares

La activación del EGFR miocárdico por estiramiento sería clave para el desarrollo de hipertrofia cardíaca (HC). Con la idea de crear una herramienta específica para inhibir al EGFR que sirviera para evaluar su posible rol en la HC desarrollamos un lentivirus de 3ra generación portador de un RNA de interferencia contra el EGFR (siRNA-EGFR). Para producir el virus se transfectaron células HEK293T con los vectores empaquetadores y el vector de transferencia con el siRNA-EGFR o la secuencia Scramble (siRNA-SCR). Se recolectó el medio de cultivo por 72 hs, se ultracentrifugó y se estimó en $1x10^8$ TU/ml el título de virus (portador de gen para proteína fluorescente roja) a partir de transducción de células HEK con diluciones seriadas y posterior conteo de células fluorescentes. Luego se co-transfectaron células HEK293T con el plásmido que codifica para el EGFR-GFP y con el que expresa el siRNA-SCR o el siRNA-EGFR. A igual cantidad de células rojas (con vector) las placas con SCR tuvieron más células verdes (expresan EGFR-GFP) que aquellas con siRNA-EGFR, donde el silenciamiento del receptor disminuyó la expresión de GFP. Seguidamente inyectamos en miocardio de ratas Wistar siRNA-EGFR (n=5) o siRNA-SCR (n=4). Un mes después comprobamos en homogenatos de ventrículo izquierdo (por WB) una reducción significativa del EGFR en animales con siRNA-EGFR (48±15 vs. 100±6%, $P<0.05$). Con la idea de probar su efectividad como inhibidor funcional del EGFR y dado que este es parte de la ruta que genera la segunda fase de fuerza (SFR) post-estiramiento miocárdico, quisimos probar si el siRNA-EGFR era capaz de inhibir la SFR en músculos papilares aislados. La SFR fue cancelada en músculos con siRNA-EGFR [en% de la fase rápida inicial: 102±1 vs. 131±2 (siRNA-SCR), $P<0.05$]. Los resultados muestran que una reducción a la mitad de la expresión de EGFR alcanza para cancelar su función sugiriendo que es una herramienta efectiva para evaluar el rol del EGFR en el desarrollo de HC.

(605) EFECTO DEL AUMENTO DEL SECUESTRO DE CA EN LAS ARRITMIAS PRODUCIDAS POR PÉRDIDA DE CA DEL RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO CARDÍACO (RS), ESTUDIADO A TRAVÉS DE UN MODELO MATEMÁTICO DE MIOCITO HUMANO

Juan Ignacio Felice[1]; Carlos Valverde[1]; Alicia Mattiazzi[1]; Elena Lascano[2]; Jorge Negroni[2]
Centro de Investigaciones Cardiovasculares, UNLP - CCT La Plata CONICET[1] Universidad Favaloro, Buenos Aires[2]

Miocitos de ratones con una mutación del canal de Ca del RS (RyR2) que mimetiza constitutivamente la fosforilación del mismo, facilitando la pérdida de Ca en diástole (ratones S2814D) presentan un aumento en las ondas arritmogénicas de Ca (Caw) y la propensión a arritmias disparadas por Ca, frente a un estrés. La ablación de PLN (proteína inhibitoria de la bomba de Ca del RS cardiaco), aumenta el secuestro de Ca por el mismo y rescata de las Caw y arritmias típicas de los ratones S2814D. Con la finalidad de estudiar si el aumento de la pérdida y el secuestro de Ca por el RS son siempre perjudiciales y protectores, respectivamente, respecto a la producción de arritmias, se utilizó un modelo de miocito humano (Lascano y col., 2013), que simuló diferentes pérdidas y aumentos del secuestro de Ca y la combinación de ambos. El modelo, fue modificado por el agregado de dos diadas que permiten simular la propagación intracelular de Ca y la producción de Caw. En condiciones basales, las simulaciones mimetizaron la dinámica de Ca intracelular observada experimentalmente en miocitos con igual alteración. Frente a una situación de estrés (alto Ca), la simulación de las condiciones de un miocito S2814D, produjo arritmias que desaparecieron cuando se agregó a la simulación el aumento del secuestro de Ca típico del miocito PLNKO (miocito SDKO). Aumentos graduales de la pérdida y del secuestro de Ca por el RS, permitieron definir una zona caliente, de alta arritmogenicidad por encima y por debajo de la cual desaparecen las arritmias. Estos resultados indican que las arritmias disparadas por Ca dependen de un estrecho balance entre la pérdida y el secuestro de Ca y que tanto el aumento del secuestro de Ca por encima de un cierto nivel respecto al basal

como su disminución, pueden suprimir las arritmias por aumento de la pérdida diastólica de Ca.

(579) EFECTO PARADÓJICO DEL AUMENTO DEL SECUESTRO DE CA POR EL RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO CARDÍACO (RS): ELEVA LA PÉRDIDA DIASTÓLICA DE CA POR FOSFORILACIÓN DEL CANAL DE CA DEL RS PERO DISMINUYE LAS ONDAS DE CA ARRITMOGÉNICAS Y LAS ARRITMIAS VENTRICULARES

Carlos Valverde[1]; Gabriela Mazzocchi[1]; Leandro Sommese[1]; Juan Felice[1]; Maríano Di Carlo[3]; Diego Fainstein[3]; Solange Bibe[2]; Pedro Gonzalez[2]; Elena Lascano[1]; Jorge Negroni[1]; Julieta Palomeque[1]; Alicia Mattiazzi[1]
Centro de Investigaciones Cardiovasculares, UNLP/CCT La Plata-CONICET[1] Fundación Favaloro[2] Cátedra de Patología, Fac. Ciencias Médicas, UNLP[3]

El aumento de la pérdida diastólica de Ca (*leak*) por el receptor de rianodina (RyR2) del RS, ocurre por mayor carga de Ca del RS o disminución del umbral al que ocurre el *leak*, dado principalmente por las características del RyR2. Si el *leak* de Ca es alto, se propaga como ondas de Ca (CaW) a través de la célula y al intercambiarse por Na vía el intercambiador Na-Ca, despolariza la membrana, produciendo postdespolarizaciones tardías y eventualmente arritmias. Este fenómeno ocurre en ratones con mutación del RyR2 que mimetiza su fosforilación por la quinasa Ca/calmodulina II, (ratones S2814D) y es el mecanismo principal de las arritmias disparadas por Ca en la insuficiencia cardíaca. Si bien el rol del aumento del *leak* en la generación de CaW es conocido, el papel del aumento del secuestro de Ca por el RS no es claro. Objetivo: Dilucidar si el aumento del secuestro de Ca disminuye o exacerba las CaW de los SD281D. Se generaron ratones doble mutantes (SDKO) resultantes de la cruza de S2814D con PLNKO, una cepa con mayor secuestro de Ca por ablación de fosfolamban, proteína inhibitoria de la bomba de Ca del RS. Los miocitos de S2814D sometidos a estrés (Ca elevado), presentaron un aumento significativo del *leak* de Ca y CaW respecto al WT. El aumento del secuestro de Ca incrementó el *leak* de 0,63±0,14 (S2814D) a 3,78±0,38 unidades de fluorescencia/100µm/seg (SDKO) P<0,05. Paradójicamente este aumento se asoció a una disminución de la frecuencia de CaW y un aumento significativo de eventos no propagados o miniwaves respecto a S2814D (relación miniwaves/CaW: 0,4±0,1, S2814D vs. 4,7±1,2, SDKO). Tanto *in vivo* como en el corazón intacto los SDKO no presentaron las arritmias típicas de los S2814D. Conclusión: El aumento del secuestro de Ca a pesar de acentuar el *leak* de Ca, protege de las arritmias disparadas por Ca por abortar las CaW, convirtiéndolas en eventos no propagados.

ONCOLOGÍA 1

01 (57) MARCADORES DE LA TRANSICIÓN EPITELIO MESENQUIMAL Y DE METÁSTASIS EN CÁNCER DE PRÓSTATA. ESTUDIOS EN LÍNEAS CELULARES Y EN MODELOS IN VIVO

María Victoria Mencucci; Marina Rosso; María José Besso; María Florencia Abascal; Adriana De Siervi; Cristian Moiola; Mónica H. Vazquez-Levin
IBYME

El Cáncer de Próstata (CaP) es el 2do cáncer de mayor incidencia en hombres, presentando alta mortalidad por la ocurrencia de metástasis. La Transición Epitelio Mesenquimal (TEM), caracterizada por la pérdida de expresión de Cadherina Epitelial (CadE), se asocia a la progresión tumoral y a la metástasis. En un estudio previo del laboratorio evaluamos la expresión de marcadores de TEM en 4 líneas de CaP y reportamos, por 1ra vez, la expresión de Dishaderina (Dys), un marcador de metástasis en otros tumores, en la línea celular de alto potencial metastásico PC3. Objetivo: Caracterizar la expresión de marcadores de TEM y de Dys en CaP y su asociación con la metástasis. Metodología: 1) Evaluación de la expresión de marcadores de TEM y de Dys en: a) seis líneas celulares de CaP humano de distinto potencial metastásico (nulo/bajo: LNCaP/C4-2/22Rv1; mediano/alto: PC3/DU-145/C4-2B), b) tumores generados por inyección subcutánea de células PC3 en ratones "nude", c) set de datos (GEO) de tumores de bajo y alto potencial metastásico generados con células PC3 luego de pasajes sucesivos in vivo por implantación ortotópica. 2) Evaluación de la expresión de marcadores de TEM y de las características funcionales de células PC3 tratadas con un siRNA de Dys (PC3-siRNA Dys). Resultados: Los estudios revelaron A) Expresión diferencial de Dys y de marcadores de TEM en las líneas celulares, asociados a su capacidad metastásica, con menores niveles de CadE y mayores niveles de Dys, ZEB1, SLUG, Vimentina y CadN en las líneas de alto potencial metastásico respecto de las de bajo potencial. B) Patrones de expresión de marcadores de TEM y Dys, en ambos modelos in vivo, similares a los observados in vitro. C) Reversión en los niveles de expresión de marcadores de TEM y mayor adhesión en las células PC3-siRNA Dys. Conclusión: En los modelos experimentales estudiados, el potencial metastásico del CaP se asoció a la TEM y a la expresión aumentada de Dys.

02 (71) EFECTO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS EN LA EXPRESIÓN Y ACTIVACIÓN DE ENZIMAS CYP3A EN CÉLULAS TUMORALES

María Del Rosario Aschero[1]; María Florencia Cayrol[1]; Helena Sterle[1]; Eduardo Valli[1]; Alejandra Paulazo[1]; Alicia Klecha[12]; María Laura Barreiro-Arcos[1]; Graciela Cremaschi[12]; María Celeste Diaz Flaque[1]
BIOMED[1] Facultad de Farmacia y BioQuímica UBA[2]

Las enzimas de la familia CYP450 metabolizan tanto compuestos exógenos como endógenos. Particularmente en humanos, la subfamilia CYP3A, está involucrada en el metabolismo de medicamentos utilizados en quimioterapia. Aunque su expresión y actividad metabólica es mayoritariamente hepática, se ha visto también expresión en otros tejidos y en tumores. Trabajos previos de nuestro laboratorio, demostraron las hormonas tiroideas (HT) a concentraciones fisiológicas, inducen la expresión de CYP3A4 en la línea celular de linfoma T (LT) humano Jurkat, a través de mecanismos no genómicos activados por un receptor de membrana (mTR), la integrina aVb3. En este trabajo evaluamos la capacidad de las HT de inducir la expresión y activación metabólica de la enzima CYP3A4 en las líneas de LT humano Jurkat, CUTL-1, HUT-78 y en la línea de cáncer de mama humano MDA-MB-231. El tratamiento de las líneas celulares con HTs a distintos tiempos regula la expresión de ARNm de los distintos miembros de la familia CYP3A (n=3, p<0,05) a través de mecanismos genómicos y no genómicos. Mediante ensayos in vitro, evaluamos la activación metabólica de CYP3A4 inducido por HT y vimos que estás aumentan el metabolismo a los mismos niveles que el conocido inductor dexametasona (n=3, p<0,05). Por otro lado, vimos que el factor de transcripción NFκB es activado por HT a través del receptor de membrana aVb3 y tiene como producto final el aumento de los niveles de CYP3A4. Estos resultados indican que las HTs modulan la expresión y activación de enzimas CYP450 a través de la activación de factores de transcripción en células tumorales. El conocimiento de los factores que regulan la expresión y actividad de las enzimas CYP450, así como los eventos moleculares participantes, contribuirán al mejoramiento de los modelos para la predicción de las respuestas a las terapias.

03 (76) LA ACTIVACIÓN CONSTITUTIVA DE FGFR-2 ESTIMULA EL CRECIMIENTO TUMORAL EN CÁNCER DE MAMA A TRAVÉS DEL ERα

Sebastian Giulianelli[12]; Cecilia Pérez Piñero[2]; Tomas Guillardoy[2]; María Gorostiaga[2]; Claudia Lanari[2]
CENPAT - CONICET[1] IBYME - CONICET[2]

La activación ligando-independiente de receptores para estrógenos (ERα) y progesterona (PR) en cáncer de mama representa un mecanismo de resistencia a las terapias convencionales que buscan bloquear principalmente la acción del ERα. Demostramos que el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2), a través de su receptor (FGFR-2), induce proliferación celular y crecimiento

tumoral en modelos humanos y murinos de la enfermedad, involucrando la activación del PR y del ERα. Mientras que la mutación C278F, que induce dimerización y activación constitutiva del FGFR-2 (FGFR-2CA), tiene un rol protumorigénico involucrando al PR. El objetivo del trabajo fue describir dicha mutación en términos de proliferación celular y crecimiento tumoral en un modelo experimental de cáncer de mama estrógeno dependiente. Generamos la línea celular MCF-7 con sobreexpresión estable de FGFR-2CA (R2CA) junto con su respectivo control con el vector vacío (pcDNA3). Demostramos que las células R2CA presentan un aumento significativo en la activación de Erk1/2 ($p<0.05$) y ERα ($p<0.01$), junto con un incremento en la expresión de PR y pS2 ($p<0.05$), en comparación a la línea pcDNA3 en condiciones basales. Además, las células R2CA tuvieron una mayor tasa de proliferación en las mismas condiciones mencionadas que las células control ($p<0.001$), y dicha estimulación fue bloqueada con el inhibidor de FGFRs, el BGJ398 como así también con el antiestrógeno ICI182780 ($p<0.001$). Finalmente, las células R2CA fueron capaces de crecer en ratones NSG en ausencia de estrógenos (E2). Paralelamente generamos xenotransplantes con ambas líneas en presencia de E2 (pellet 5mg), observando un crecimiento tumoral significativamente mayor ($p<0.05$) en las células R2CA respecto a la línea control. Los resultados presentados indican que la mutación C278F en el FGFR-2 sería capaz de alterar la señalización no sólo por PR sino también por ERα, mediando proliferación celular y crecimiento tumoral en cáncer de mama.

04 (208) LA HISTAMINA REDUCE SELECTIVAMENTE LA HEPATO Y CARDIOTOXICIDAD INDUCIDA POR EL QUIMIOTERÁPICO DOXORRUBICINA MEJORANDO SU EFICACIA ANTITUMORAL

Diego Martinel Lamas[12]; Melisa Nicoud[1]; Juan Carlos Perazzo[3]; Helena Sterle[1]; Graciela Cremaschi[12]; Elena Rivera[2]; Vanina Medina[12]

Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED), Facultad de Ciencias Médicas, Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA), y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires[1] Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires[2] Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA[3]

Reportamos que la histamina (HA) ejerce un efecto selectivo frente a los efectos deletéreos de la radiación, protegiendo los tejidos normales y aumentando la radiosensibilidad de las células de cáncer mamario humano MDA-MB-231 y MCF-7 tanto in vivo como in vitro. También observamos un efecto citoprotector frente a los efectos de la doxorrubicina (DOX) en ratas. El objetivo del trabajo fue profundizar en el efecto citoprotector selectivo de la HA sobre la cardio y la hepatotoxicidad de la DOX. Para ello se estudiaron tres modelos de roedores. Ratas Sprague Dawley, ratones nude xenotransplantados con la línea MDA-MB-231 y ratones Balb/c knockout para los RH4 (RH4-/-) en relación a sus correspondientes tipos salvajes. Los animales se separaron en 4 grupos: control (vehículo), histamina (1 o 5 mg/kg, s.c, diariamente), DOX (2 mg/kg, ip, 3 veces por semana) y tratamiento combinado, por 2 semanas. La DOX produjo severos daños histológicos en corazón (necrosis, miocitolisis y hemorragia focales) e hígado (desorganización sinusoidal, disminución de células de Kupffer, áreas de necrosis focal, aumento de apoptosis); aumentó el daño al ADN (8-OHdG), la peroxidación lipídica y redujo el peso de los órganos. El tratamiento combinado con HA redujo las alteraciones histológicas, inhibió la apoptosis, el daño oxidativo a membranas [TBARS (nmol/mg de corazón): 22.9±1.2 vs. 32.7±1.9 en ratas DOX, $P<0.05$; 85.7±18.5 vs. 363.8±52.4 en ratones DOX, $P<0.01$] y al ADN, preservando el peso de los órganos y aumentando los niveles de tioles tanto en ratas como ratones. Además, la HA preservó la actividad antitumoral de DOX, produciendo un efecto sinérgico antiproliferativo en células MDA-MB-231, modulando el daño oxidativo, el ciclo celular y la apoptosis. El efecto selectivo se verificó en el modelo in vivo donde la HA potenció la reducción del tamaño tumoral y protegió hígado y corazón. Podemos concluir que la HA podría ser un potencial citoprotector frente a los efectos adversos de la DOX.Agradecimientos: Instituto Nacional del Cáncer, CONICET, UBA

05 (242) GALECTINA-1 MODULA LA MIGRACIÓN Y ADHESIÓN AL ENDOTELIO TUMORAL HEPÁTICO Y PROTEGE A LOS HEPATOCITOS TUMORALES DE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO INDUCIDO POR TGF-β1

Malena Manzi[1]; María Lorena Bacigalupo[1]; Pablo Carabias[1]; María Teresa Elola[1]; Carlota Wolfenstein[1]; Gabriel Adrian Rabinovich[2]; María Victoria Espelt[1]; María Fernanda Troncoso[1]

IQUIFIB-UBA-CONICET[1] IBYME-CONICET[2]

La sobreexpresión de Galectina-1 (Gal1), una proteína que une β-galactósidos, en ciertos tumores y en células endoteliales asociadas al tumor, se relaciona con la agresividad y diseminación tumoral, y la angiogénesis. Previamente demostramos que Gal1 modula la proliferación de células de carcinoma hepatocelular (CHC) humanas, HepG2, y de células endoteliales hepáticas SK-HEP-1. Nuestro objetivo fue estudiar la participación de Gal1 en el microambiente tumoral hepático. La expresión de Gal1 en células SK-HEP-1 aumentó en ausencia de suero (155±15%) y en presencia de medios condicionados (MCs) obtenidos de monocapas de hepatocitos tumorales HuH-7 (secretan altos niveles de Gal1) (147±18%). Gal1 recombinante al igual que los MCs de células HepG2Gal1 (sobreexpresan Gal1) promovieron la migración de células SK-HEP-1 (161±2%; 178±8%, 9h). El factor de crecimiento transformante β1 (TGFβ1) aumenta en el CHC. En células HepG2 y HuH7, TGFβ1 (5ng/ml, 48h) aumentó la expresión de Gal1 (230±21%, 180±14%) y su secreción a los MCs (141±4%, 262±39%). Mediante microscopía de fluorescencia, se observó que la sobreexpresión de Gal1 y la preincubación con TGFβ1 aumentaron la adhesión de células HepG2 a monocapas de células SK-HEP-1 (146±5%; 118±4%, 15min). TGFβ1 induce apoptosis en ciertas líneas celulares de CHC, sin embargo, las células HepG2 son resistentes. La incubación con TGFβ1 por 48h no afectó la viabilidad de células HepG2 (94±4%), pero sí la redujo en células HepG2-Gal1siRNA con expresión de Gal1 disminuida (70±8%). Aunque luego de 5 días de tratamiento, las células HepG2 mostraron una reducción de la viabilidad (83±3%), las células HepG2Gal1 se mantuvieron resistentes a la muerte (101±3%). El aumento de Gal1 en el microambiente del CHC, en parte inducido por TGFβ1, controla la migración de las células endoteliales hepáticas, y favorece la adhesión de los hepatocitos tumorales al endotelio. Gal1 y TGFβ1 actuarían en conjunto favoreciendo la progresión del CHC.

342 (292) REPOSICIONAMIENTO DE DROGAS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER: TERAPIA METRONÓMICA CON METFORMINA Y PROPRANOLOL

Nahuel Cesatti Laluce[14]; María J Rico[124]; M Virginia Baglioni[1]; Viviana R Rozados[1]; O. Graciela Scharovsky[13]; Mauricio Menacho-Márquez[12]

Instituto De Genética Experimental, Fac. Ciencias Médicas, UNR[1] CONICET[2] CIUNR[3] Contribuyeron Igualmente[4]

La importancia clínica de la patología oncológica demanda la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que se adapten mejor a tratamientos crónicos. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de Metformina (M) y Propranolol (P) administradas en esquema metronómico en forma individual o combinada en un modelo de adenocarcinoma murino triple negativo. Se estudiaron los efectos individuales y combinados de las drogas en células 4T1 a través de ensayos estándares de viabilidad, clonogenicidad, migración, invasión y apoptosis. Se observó disminución del crecimiento en un modo dosis dependiente (M: $P<0,05$; P: $P<0,01$ para todas las dosis evaluadas); disminución en la capacidad clonogénica (M+P: $P<0,001$); aumento en la apoptosis ($P<0,05$ para M y P; $P<0,001$ para M+P) y disminución de la capacidad migratoria (M+P: $P<0,001$) e invasiva (M+P: $P<0,01$). Del mismo modo, la combinación M+P mostró un efecto inhibitorio sinérgico sobre el crecimiento celular ($P<0,001$). Para los estudios in vivo se desafiaron ratones BALB/c por inyección s.c. de células 4T1 (104

cél/100µL). Los animales se distribuyeron en 4 grupos (n=6/grupo) recibiendo los siguientes tratamientos en el agua de bebida: 1) Control, sin tratamiento; 2) M (2 g/l); 3) P (25 mg/l); 4) tratados como 2+3. Los animales se pesaron y los tumores se midieron con calibre dos veces por semana. Se encontró que el tratamiento combinado produjo una disminución del volumen tumoral (P<0,05 a partir del día 14) y un aumento de la supervivencia (P<0,05). El tratamiento combinado presentó un fuerte efecto antitumoral tanto in vitro como in vivo. La información obtenida a partir de los experimentos contribuye valiosamente a considerar en un futuro cercano nuevas indicaciones terapéuticas de ambas drogas, así como a profundizar la investigación de esquemas de administración metronómica, como recurso de un nuevo paradigma terapéutico: un tratamiento crónico, para una patología crónica.

06 (582) EL TRATAMIENTO CON 4-METILUMBELIFERONA (4MU) MODULA EL MICROAMBIENTE TUMORAL Y AUMENTA LA EFECTIVIDAD ANTITUMORAL DE LA INMUNOTERAPIA COMBINADA EN CÁNCER DE COLON

Maríana Malvicini[1]; Valentina Ghiaccio[2]; Esteban Fiore[1]; Flavia Piccioni[1]; Miguel Rizzo[1]; Laura Alaniz[1]; Maríana Garcia[1]; Juan Bayo[1]; Pablo Matar[3]; Guillermo Mazzolini[1]
Universidad Austral[1] Università Degli Studi Di Cagliari, Cerdeña, Italia[2] Instituto De Genética Experimental, Facultad De Ciencias Médicas, Universidad Nacional De Rosario[3]

El uso de una dosis baja de ciclofosfamida (Cy) y la terapia génica con IL-12 (AdIL-12) produce una respuesta inmunitaria antitumoral sinérgica en ratones con cáncer de colon. 4-metilumbeliferona (4Mu) es un inhibidor de la síntesis de ácido hialurónico (AH), que se encuentra en elevadas concentraciones en los diversos tumores, inclusive el cáncer de colon. Evaluamos el efecto de la modulación del microambiente tumoral mediante la administración de 4Mu sobre la eficacia terapéutica de la combinación Cy+AdIL-12. Previamente hemos demostrado que la combinación de 4Mu+Cy+AdIL-12 es capaz de eliminar más del 70% de los tumores en los animales inoculados con células CT26, reduciendo los niveles de AH y modulando los niveles de ciertas moléculas asociadas al proceso de angiogénesis. Con el objetivo de profundizar en los mecanismos subyacentes al potente efecto terapéutico de esta combinación se inocularon ratones Balb/c con células CT26 (5 x105, s.c, día 0); cuando los tumores alcanzaron un volumen de 85mm3 (día 7) se distribuyeron en grupos que recibieron solución salina ó 4Mu (200mg/kg/día, vía oral, durante 21 días). Se evaluó evolución del tamaño tumoral, se determinó la presión intratumoral, y se tomaron muestras para su análisis. Resultados: En los animales tratados con 4Mu observamos una disminución significativa de la presión intratumoral (p<0,001) así como también un aumento significativo de la perfusión del tejido tumoral (p<0,001). Los animales tratados con 4Mu mostraron un incremento en la expresión génica tras la administración intratumoral de un vector adenoviral (p<0,05). Además, el tratamiento con 4Mu permitió una mayor llegada de linfocitos antitumorales administrados por vía sistémica al entorno tumoral y, por ende, un mayor efecto terapéutico (p<0,05). Conclusiones: nuestros resultados sugieren que el tratamiento con 4Mu y los efectos que genera en el microambiente tumoral, tales como menor presión intratumoral y mayor perfusión, potencia el efecto terapéutico de la inmunoterapia basada en Cy+AdIL-12.

07 (656) EL AGONISTA BETA-2 ADRENÉRGICO SALBUTAMOL INHIBE LA CAPACIDAD METASTÁSICA DE CÉLULAS TUMORALES MAMaríaS HUMANAS.

Ezequiel Maríano Rivero[1]; Lucia Gargiulo[1]; Ariana Bruzzone[2]; Cecilia Perez Piñero[1]; Isabel Luthy[1]
IBYME[1] INIBIBB[2]

Adrenalina y noradrenalina son liberadas durante el estrés y los receptores adrenérgicos (RA) median su respuesta. Hemos asociado la estimulación de receptores B2-adrenergicos (B2-RA) a una inhibición de la proliferación de células de cáncer de mama humanas y del crecimiento tumoral. Demostramos previamente que salbutamol (salb), un agonista B2, inhibe la actividad de metaloproteasa de la matriz 9 en células de cáncer de mama MDA-MB-231. Se desconocen sus efectos en las etapas subsiguientes de la cascada metastásica. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de salb (agonista B2-RA) sobre invasión y metástasis en líneas tumorales maMarías humanas. Se utilizaron insertos cubiertos con matrigel para evaluar la invasión celular in vitro. Para realizar el ensayo de metástasis experimentales in vivo se inyectaron 500000 células MDA-MB-231 por vía intravenosa a ratones NSG hembras. Los animales se trataron diariamente con la droga o vehículo. Las metástasis se cuantificaron macroscópicamente y en cortes histológicos. La invasión de células MDA-MB-231 disminuyó significativamente ante al tratamiento con salb 1uM (39.9 +/- 7.0% del control, p<0.01) siendo este efecto revertido por el antagonista B2 propanolol (p<0,01). In vivo, sólo se encontraron metástasis pulmonares. Al cuantificar macroscópicamente los nódulos metastásicos en la superficie del órgano se observó una disminución significativa en los animales tratados con salb respecto al vehículo (86.9 +/- 8.2 vs 146.5 +/- 16.2, p<0.01) no observándose diferencias significativas en el tamaño de las mismas. En cortes histológicos las metástasis se encontraron disminuidas en el grupo tratado (181.3 +/- 10.9 vs 263.9 +/- 11.8, p<0.001). En conjunto con los resultados previamente presentados, estos datos evidencian la importancia del B2-RA en la progresión del cáncer de mama. Destacan también los posibles usos terapéuticos para el salbutamol ya que inhibe tanto el crecimiento tumoral como las metástasis.

08 (35) EL COMPLEJO Gβγ PARTICIPA EN LA SEÑALIZACIÓN DE CRH EN CÉLULAS NEURONALES HIPOCAMPALES

Paula Ayelén Dos Santos Claro[12]; Carolina Inda[12]; Sergio Senin[1]; Susana Silberstein[12]
Instituto De Investigación En Biomedicina De Buenos Aires-CONICET-MPSP[1] Departamento Fisiología, Biología Molecular Y Celular, Fac. De Cs.Exactas Y Naturales, UBA[2]

CRH ejerce un rol central en la respuesta neuroendócrina y comportamental al estrés, dirigiendo la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y actuando como neuromodulador en el sistema nervioso central. Su desregulación se relaciona con desórdenes como ansiedad/depresión y enfermedad de Cushing. Nuestro objetivo es definir las vías de señalización de CRH por el receptor CRHR1 y los componentes involucrados, con potencial relevancia terapéutica en desórdenes ligados a estrés. CRHR1 es un GPCR cuya señalización involucra las vías del AMPc, las MAPKs y el calcio. La proteína G heterotrimérica acoplada a GPCRs está formada por las subunidades α, β y γ. Nos propusimos determinar si el complejo Gβγ está involucrado en la señalización de CRHR1 mediada por CRH. Utilizamos como modelo la línea celular neuronal hipocampal HT22, que expresa establemente el CRHR1 (HT22-CRHR1). Empleando un scavenger de Gβγ (sobreexpresión de la subunidad Gα de transducina) y un inhibidor farmacológico (galeína) analizamos la participación del complejo en las vías de señalización. Mediante sensores de FRET observamos que el bloqueo genético y farmacológico de Gβγ disminuyó significativamente la respuesta global de AMPc mediada por CRH (p< 0,05 respecto del control). El análisis por WB de las formas fosforiladas mostró que la activación de CREB, efector clásico de la vía de AMPc, y la de ERK1/2 se encontraron disminuidas en células en las que se bloqueó el complejo. Por RT-PCR exploramos la expresión de las adenilil ciclasas en células HT22-CRHR1. Detectamos tanto formas estimulables como inhibibles por Gβγ, lo que sugiere que la respuesta de AMPc proviene de un balance entre la contribución relativa de cada una de estas enzimas. Estos resultados indican que el complejo Gβγ participa en la señalización de CRH a través de CRHR1 en el contexto neuronal hipocampal y contribuyen a definir los mecanismos implicados a nivel central. Apoyado por ANPCyT, CONICET, UBA y FOCEM (COF 03/11).

09 (66) ROL DEL ANIÓN CLORURO COMO SEGUNDO MENSAJERO EN LA MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES ESPECÍFICOS

Angel Gabriel Valdivieso; Maringeles Clauzure; María Macarena Massip Copiz; Carla Estefana Cancio; Consuelo Mori; Asensio Cristian; Tomas Antonio Santa Coloma
Biomed;Pont.Univ.Cat.Arg."Sta.María De Los Bs.As."

La Fibrosis Quística (FQ) es causada por mutaciones en el gen CFTR que codifica un canal de transporte de iones cloruro (Cl^-) activado por AMPc. Numerosos genes-CFTR dependientes han sido identificados, aunque se desconoce el mecanismo de regulación involucrado. Debido a que el CFTR es un canal de Cl^-, la alteración de su actividad conduciría a cambios en la concentración intracelular de Cl^- ($[Cl^-]i$). Nuestra hipótesis es que la $[Cl^-]i$ podría formar parte del mecanismo de señalización en la modulación de genes específicos. Mediante la técnica de "Differential display" se analizó el perfil de expresión en células IB3-1, línea celular de FQ, incubadas con una curva de concentración de Cl^- en presencia de dos ionóforos (tributyltin y nigericina), lo que permite equilibrar rápidamente la $[Cl^-]i$ con la concentración de Cl^- extracelular, independientemente de la función del CFTR y de otros canales de Cl^-. Mediante esta estrategia, observamos varios genes expresados diferencialmente. Dos de estos genes expresados diferencialmente por la $[Cl^-]i$ fueron aislados, clonados y secuenciados. La modulación de la expresión de estos genes por el anión Cl^- fue validada por RT-PCR cuantitativa en tiempo real. El primero de estos genes fue identificado como el gen RPS27 que codifica la proteína ribosomal S27. El mismo mostró una regulación negativa por el aumento de la $[Cl^-]i$ salvo a concentraciones no fisiológicas, por encima de 100 mM, para las cuales mostró una modulación positiva (respuesta bifásica para la $[Cl^-]i$). El segundo gen identificado, modulado positivamente por el aumento de la $[Cl^-]i$, correspondió al gen GLRX5, que codifica la proteína glutarredoxina-5, de localización mitocondrial. Estos resultados sugieren que el anión Cl^- actuaría como segundo mensajero, modulando la expresión de genes específicos en respuesta a cambios en la $[Cl^-]i$. Agradecimientos: CONICET, PIP2012-2014-0685 y PICT2012-1278 de la ANPCYT.

10 (399) LA EXPRESIÓN DE FILAMINA-A MODULA EN FORMA NEGATIVA LA ACTIVACIÓN DE NF-κB POR S1P EN MELANOMA MEDIANTE LA INHIBICIÓN DE AKT

Ludmila E. Campos[1]; Melina G Castro[1]; Yamila I Rodríguez[1]; Pablo Lopez Bergami[3]; Mercedes Borge[4]; Sergio E Alvarez[12]
IMIBIO-SL[1] Universidad Nacional De San Luis[2] Instituto De Medicina Y Biología Experimental[3] Instituto De Medicina Experimental (IMEX) - CONICET[4]

Filamina A (FlnA) es una proteína del citoesqueleto que se une a muchas proteínas involucradas en señalización. Si bien FlnA ha sido clásicamente asociada con migración celular, recientes estudios indican que su expresión se correlaciona en forma negativa con la capacidad invasiva de células tumorales. Previamente, demostramos que esfingosina-1-fosfato (S1P) extracelular induce la activación del factor de transcripción NF-κB sólo en células de melanoma que no expresan FlnA. Tanto S1P, un mediador lipídico que puede actuar como segundo mensajero intracelular o en forma paracrina/autocrina a través de la unión a receptores acoplados a proteína G, denominados S1P1-5, como NF-κB se relacionan a procesos de inflamación crónica y progresión tumoral. En esta oportunidad, mostramos que la expresión de FlnA inhibe la activación de NF-κB por S1P extracelular en varias líneas celulares tumorales humanas de melanoma y de neuroblastoma, sugiriendo que es un mecanismo regulatorio normal. Además, a través del uso de SEW2871, agonista específico del receptor S1P1, corroboramos la participación del mismo en esta vía. Llamativamente, en células que expresan FlnA, la estimulación con S1P induce una disminución en pAkt, lo cual nos sugiere que elevados niveles de pAkt son necesarios para activar NF-κB. Para corroborar la hipótesis, células de melanoma que expresan FlnA fueron transfectadas establemente con Akt-myr para mantener una actividad basal alta de pAkt. Interesantemente, en estas células S1P estimula NF-κB pese a la expresión de FlnA. A nivel funcional, resultados preliminares sugieren que S1P mantiene el crecimiento en ausencia de suero solo en células de melanoma que no expresan FlnA. En conclusión, nuestros resultados demuestran que la expresión de FlnA regula en forma negativa la activación de NF-κB por S1P a través de la inhibición de Akt. Asimismo, la deficiencia de FlnA, al menos en ciertas condiciones, favorecería la progresión tumoral.

012 (442) 17-β-ESTRADIOL PROMUEVE LA ADHESIÓN Y MIGRACIÓN CELULAR VIA FAK/PAXILLIN/CDC42/N-WASP/ARP2/3 COMPLEX EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA

Ivonne D. Uzair; Jorge E. Shortrede; Flavia J. Neira; Marina I. Flamini; Angel M. Sanchez
IMBECU

La migración de las células cancerígenas es crucial para el desarrollo de una metástasis, principal causa de muerte en mujeres que padecen cáncer de mama. Para ello, el citoesqueleto de actina juega un rol fundamental. El mismo está regulado por proteínas que, en respuesta a ciertos estímulos, ponen en marcha la maquinaria que permite a las células migrar e invadir tejidos circundantes. Los moduladores Paxilina y N-WASP, unen estímulos extracelulares hacia la reorganización actínica. N-WASP actúa como una proteína andamio y responde a señales de pequeñas GTPasas (Cdc42) provocando la activación del complejo Arp2/3, responsable de la ramificación y nucleación actínica. Nuestro trabajo propone al 17-β-estradiol (E2) como un importante regulador en diversas vías de señalización promoviendo la adhesión, migración e invasión de células de cáncer de mama. Nuestros resultados han demostrado que E2 induce la fosforilación/activación/translocación de Paxilina hacia los sitios donde se ensamblan los complejos de adhesión focal. Este proceso fue mediado a través del receptor de estrógeno α (ERα)-proteína Gαi1/Gβ, hacía el complejo c-Src/FAK/Paxilina. Una vez que Paxilina es activada, recluta a Cdc42 y provoca la fosforilación de N-WASP, resultando en la translocación del complejo Arp2/3. Además, observamos como el reclutamiento de FAK/Paxilina/N-WASP fue necesario para los procesos de adhesión, migración e invasión celular inducidos por E2. Por otro lado, investigamos como el Raloxifeno (modulador selectivo del receptor de estrogéno), en presencia de E2, fue capaz de disminuir los niveles de fosforilación/activación de FAK, Paxilina y N-WASP, reduciendo significativamente los procesos de adhesión/migración celular. Nuestros estudios sugieren a Paxilina como un importante modulador sobre la motilidad celular en las células MCF-7, promoviendo el estudio para el desarrollo de posibles nuevos blancos, sobre proteínas quinasas, para intervenciones terapéuticas en dicha patología.

013 (469) REGULACIÓN DE AR Y GR POR PROTEÍNAS CON DOMINIO TPR

Gisela I Mazaira[12]; Fernando Federicci[2]; Mario D Galigniana[23]
IQUIBICEN[1] Dto. Química Biológica - Fac. De Ciencias Exactas Y Naturales - Univ.De Buenos Aires[2] IBYME[3]

Las proteínas con dominio TPR (tetratricopeptide repeat) mejor caracterizadas son las que forman complejos con receptores de esteroides vía la chaperona Hsp90, afectando su plegamiento y ensamblado. Las inmunofilinas FKBP51 y FKBP52 son proteínas TPR que regulan antagónicamente la actividad transcripcional y localización subcelular de GR y MR. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto de otras proteínas TPR como PP5, SGT1α y 14-3-3σ sobre GR y AR. Demostramos que PP5 favorece la retención nuclear de GR, 14-3-3σ retrasa la importación y acelera la exportación, mientras que SGT1α no afecta su distribución subcelular, aunque inhibe la actividad transcripcional de ambos receptores. En tal sentido, PP5 y 14-3-3σ muestran una respuesta bifásica, es decir, un aumento leve de la expresión estimula la transcripción, pero se inhibe con niveles más altos. Ninguna de las proteínas ensayadas afectó la importación de AR, pero sí su actividad transcripcional. PP5 estimula la actividad de AR, mientras que 14-3-3σ y SGT1α la inhiben. Nuestros resultados sugieren que el balance de expresión de estas proteínas podría afectar el balance de actividad entre AR y GR, lo que podría influir en el desarrollo y progresión de patologías tales el cáncer prostático. Dado que al presente no existen drogas específicas para cada proteína TPR, realizamos un abordaje farmacológico usando

como blanco a Hsp90 con la que forman una unidad estructural y funcional. Ensayamos derivados del 2,4-dihidroxibenzaldehido, del 5-cloro-2,4-dihidroxibenzaldehido, o del resorcinol diseñados por modelado computacional como potenciales inhibidores de la actividad ATPasa de Hsp90, la que es clásicamente considerada clave para la función biológica de la chaperona. Los compuestos decrecieron la viabilidad celular. No obstante, ni la importación ni la actividad de los receptores se vieron afectadas independientemente del efecto sobre la actividad ATPasa de Hsp90.

014 (526) RAC3: UN INHIBIDOR CLAVE DE LA SENESCENCIA Y EL ENVEJECIMIENTO

Pablo Nicolas Fernandez Larrosa[1]; Marina Ruz Grecco[1]; Diego Mengual Gómez[2]; Cecilia V Alvarado[1]; Laura C. Panelo[1]; María Fernanda Rubio[1]; Daniel F Alonso[2]; Daniel E. Gómez[2]; Mnica A. Costas[1]
IDIM-CONICETt[1] Laboratorio De Oncología Molecular, Universidad Nacional De Quilmes[2]

RAC3 es un coactivador nuclear sobreexpresado en tumores, y con funciones oncogénicas tanto en núcleo como citoplasma, como la inhibición de la apoptosis y la autofagia. Además, su expresión es necesaria para mantener la capacidad pluripotente y de auto-renovación de stem cells embrionarias. En este trabajo se investigó el rol de RAC3 en la senescencia y el envejecimiento. La sobreexpresión de RAC3 en la línea celular no tumoral HEK293(RAC3) inhibió la senescencia prematura con respecto a las wt, inducida por tratamiento con 150µM de H_2O_2 o 50nM de Rapamicina (RP), evaluada a los 6 días post tratamiento por presencia de núcleos grandes (tinción con Hoescht: Wt, 60% con H_2O_2 y 50% con RP; RAC3, 20% con H2O2 y 15% con RP; p<0,01) o por actividad de ßgal ácida (Wt: 60% con H2O2 y 65% con RP; RAC3: 25% con H2O2 y 35% con RP;p<0,01) y confirmación de arresto por análisis de ciclo celular. El mecanismo involucra no solo una inhibición de autofagia (45% en las wt con H2O2 o RP & 10% en las RAC3), sino también un aumento en las wt (versus las RAC3) de los niveles y localización nuclear de p53 y p21, FOXOs y SIRT1. Además, la depleción de RAC3 en la línea tumoral Hela (con altos niveles de RAC3) indujo senescencia replicativa, asociada con una disminución de la actividad de la telomerasa. Finalmente, se analizó los niveles de senescencia (por núcleos grandes y ßgal ácida), la expresión de RAC3 y p21 (por WB y RT-PCR) en hígados de ratas wistar jóvenes versus viejas; observándose que la proporción de células senescentes estaba elevada en las ratas viejas, al igual que los niveles de p21 (mientras que los niveles de RAC3 estaban disminuidos), con respecto a las jóvenes. Nuestros resultados permiten concluir que RAC3, además de inhibir la apoptosis y la autofagia, es un inhibidor de la senescencia, el cual está regulado negativamente durante el envejecimiento, lo que podría jugar un rol clave en el desarrollo tumoral, eliminado la expansión clonal de células con DNA dañado y potencialmente tumorales.

REPRODUCCIÓN 1

015 (80) PARTICIPACIÓN DEL SITIO DE UNIÓN PARA EL FACTOR SF1 EN LA REGIÓN PROXIMAL DEL PROMOTOR DE LA HORMONA ANTI-MÜLLERIANA (AMH) Y DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS (AR) EN LA REPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA AMH EN UNA LÍNEA DE CÉLULAS DE SERTOLI DE RATÓN

Nadia Y. Edelsztein[1]; Clara Valeri[1]; Helena F. Schteingart[1]; Rodolfo A. Rey[12]
CEDIE, CONICET-FEI-División de Endocrinología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires.[1] Dpto. Biología Celular, Histología, Embriología y Genética, Facultad de Medicina, UBA.[2]

La expresión de la AMH en la célula de Sertoli es inhibida por los andrógenos por un mecanismo desconocido. Evaluamos si existe una acción directa de los andrógenos sobre el promotor de la AMH con ensayos de luciferasa en la línea SMAT1 (Sertoli de ratón prepuberal), transfectada con el AR y variantes del promotor de la AMH. Los resultados se expresan como% (media±EE); la actividad basal se consideró 100%; se analizó mediante prueba de t de muestra única contra el valor teórico de 100%. Hubo una disminución de la actividad del promotor [-1a-3068] luego de incubar con DHT (10-7M) por 5 min (64,0±6,0%; P=0,002) o 24 hs (44,5±2,9%; P<0,0001). La inhibición se revirtió al coincubar con el antiandrógeno Casodex® (10-5M) durante 5 min (117,8±12,6%; P=0,29) o 24 hs (131,9±20,2%; P=0,21), lo que sugiere que el efecto es vía AR. La incubación con DHT disminuyó la actividad del promotor proximal [-1a-423] (53,4±8,2%; P=0,01), indicando que esa región participa en la inhibición mediada por andrógenos. Dicha región carece de elementos de respuesta a andrógenos inhibitorios conocidos, por lo que evaluamos si la acción del AR se debe a una interacción con factores trans-activadores del promotor de la AMH transfectando el promotor [-1a-3068] con los sitios de unión para GATA4, AP1 y SF1 salvajes o mutados. La inhibición observada en respuesta a la DHT se conservó en presencia de las mutaciones de los sitios GATA4 (73,8±7,0%; P=0,03) y AP1 (72,9±4,1%; P=0,003), pero no al estar mutado el sitio SF1 (102,2±11,1; P=0,85), indicando que la ausencia de dicha secuencia es suficiente para anular el efecto inhibitorio de los andrógenos. Concluimos que la DHT es capaz de inhibir la actividad del promotor de AMH por acción directa sobre la célula de Sertoli; dicha acción involucra al AR y al sitio de unión para SF1 presente en el promotor proximal. El efecto podría deberse a una acción directa del AR sobre el promotor o al desencadenamiento de "vías rápidas" de señalización alternativas.

016 (84) FUNCIÓN DEL SISTEMA WNT/BETA-CATENINA EN LA REGULACIÓN DEL DESARROLLO FOLICULAR Y LUTEINIZACIÓN

Paula Accialini[1]; Griselda Irusta[1]; Diana Bas[1]; Fernanda Parborell[1]; Dalhia Abramovich[1]; Marta Tesone[12]
IBYME[1] Fac. de Cs.Exactas y Naturales, Univ. de Buenos Aires[2]

Wnt/beta-catenina es una vía de señalización muy conservada que regula la homeostasis celular. El objetivo de este estudio fue determinar el rol que cumple esta vía sobre la funcionalidad del ovario. Ratas prepúberes estimuladas con eCG fueron inyectadas en la bursa de ambos ovarios con un inhibidor de la vía de Wnt (XAV939, 5ug/ovario) o con el vehículo de la droga (DMSO, grupo control). Luego de la cirugía los animales fueron inyectados con hCG. Luego de 48 horas, los ovarios fueron removidos y muestras de sangre fueron recolectadas para medición de progesterona (P) sérica. Un ovario fue fijado para técnicas histológicas y el otro fue utilizado para aislar Cuerpos Luteos (CL) para extracción de proteínas. La inhibición de Wnt produjo una tendencia hacia un menor porcentaje de CL y generó un aumento significativo de quistes. Se observó una disminución significativa de la P sérica y el contenido luteal de StAR en el grupo inyectado con XAV939. No se observaron diferencias en el contenido de P450scc y 3 beta-HSD. La inhibición de Wnt produjo un aumento significativo en la relación de proteínas proapoptóticas/antiapoptóticas y una disminución significativa de la proliferación de las células luteales. La fosforilación de ERK también disminuyó significativamente luego del tratamiento. La inmunohistoquímica contra Caspasa 3 clivada reveló una mayor inmunomarcación en los ovarios tratados con XAV939. Estudios de marcadores angiogénicos mostraron una disminución significativa de Lectina BS-1 (marcador de células endoteliales) y una tendencia hacia un menor contenido luteal de VEGF-A en el grupo tratado con el inhibidor. En conclusión, a nivel ovárico la inhibición de Wnt produjo una tendencia hacia un menor porcentaje de CL acompañado de un aumento en el porcentaje de quistes. Además, Wnt/beta-catenina actúa como una vía de supervivencia en el CL y estaría involucrada en la regulación de la angiogénesis luteal. Financiamiento: CONICET (PIP N° 380) y Fundación Barón

017 (136) SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA (OHSS): ROL DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS TIPO B (PDGF-B) Y SU POTENCIAL USO COMO ESTRATEGIA TERAPÉUTICA

Natalia M Pascuali[1]; Leopoldina Scotti[1]; Maríana Di Pietro[1]; Pomilio C[2]; Saravia F[12]; Denise Mesquiatti[1]; Marta Tesone[12]; Dalhia Abramovich[1]; Griselda Irusta[1]; Fernanda Parborell[1] IBYME[1]
Depto. de Química Biológica, Facultad de Cs. Exactas y Naturales, UBA.[2]

El OHSS es una complicación del crecimiento folicular causada por la inducción de la ovulación en tratamientos de fertilización asistida (prevalencia: 5-10%). Se caracteriza por un aumento en folículos maduros y quistes y en la producción de factores vasoactivos, que inducen mayor permeabilidad vascular (ascitis). Previamente, observamos que VEGF y ANGPT1 aumentan en fluidos foliculares de pacientes con OHSS, mientras que PDGF-B y -D disminuyen. Además, observamos en el modelo de OHSS en rata que PDGF-B reduce los quistes luteales y restituye a niveles normales la expresión de claudina-5, proteína clave en permeabilidad vascular. El objetivo fue estudiar el efecto de PDGF-B en el modelo de OHSS sobre la estabilidad y permeabilidad vascular y la esteroidogénesis. Ratas prepúberes se inyectaron con eCG (50 IU) durante 4 días consecutivos y 24 h después con hCG (25 IU) (grupo OHSS). Al grupo OHSS+PDGF-B se le inyectó PDGF-B recombinante (0,5 ug/ovario) intrabursa. El grupo control recibió eCG (25 UI) en el día 3 y hCG (10 UI) en el día 5. Luego de 48 h, los animales fueron sacrificados y se extrajeron los ovarios. Los niveles de P4 (RIA) aumentaron en el grupo OHSS ($p<0,001$), mientras que PDGF-B los revirtió a valores controles. La expresión de 3β-HSD aumentó en el grupo OHSS respecto del control ($p<0,05$), pero PDGF-B lo redujo a niveles similares al control. Por IHQ para α-actina (marcador de células periendoteliales), se vio que PDGF-B aumentó el área periendotelial en CL y quistes, otorgando mayor estabilidad vascular. Por microscopía confocal, se analizó el extravasado de fluoresceína de sodio como parámetro de permeabilidad vascular. El grupo OHSS+PDGF-B mostró áreas de extravasado menos extensas en comparación con OHSS en CL y estroma, similares al control. En conclusión, PDGF-B sería crucial en la regulación de la esteroidogénesis e integridad vascular ovárica en OHSS, por lo que constituiría una buena estrategia terapéutica para disminuir la severidad del síndrome.

018 (218) COMPUESTOS ACTIVOS PROVENIENTES DEL ROMERO Y DE LA MEDICINA HERBAL CHINA EVALUADOS COMO NUEVAS TERAPIAS NATURALES PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENDOMETRIOSIS

Luciana Ferella[1]; Juan Ignacio Baston[1]; Mariela Bilotas[1]; José Javier Singla[2]; Alejandro Gonzalez[3]; Carla Olivares[1]; Gabriela Meresman[1] Ibyme[1]
Htal. de Clínicas "José de San Martín"[2] Htal. Naval de Buenos Aires Dr Pedro Mallo[3]

La endometriosis (EDT) es una enfermedad ginecológica caracterizada por el crecimiento de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina. Afecta alrededor del 10% de la población femenina, siendo los principales síntomas infertilidad y dolor. Debido a la cuestionada eficiencia y a la alta tasa de recidivas observada luego de los tratamientos habituales, se están investigando alternativas terapéuticas que puedan administrarse por plazos prolongados sin comprometer el bienestar de la paciente. El objetivo de nuestro trabajo es evaluar in vitro e in vivo el efecto del flavonoide wogonina (WG) aislado de la raíz de Scutellaria baicalensis, componente principal de la medicina herbal china, y de dos compuestos activos del extracto de romero (Rosmarinus officinalis): ácido carnósico (AC) y ácido rosmarínico (AR). Hemos observado que WG 40, 80 y 160µM, AC 10, 12.5 y 25µg/ml y AR 25, 50 y 100µg/ml inhibieron significativamente la proliferación de la línea celular estromal endometrial humana (T-HESC) ($p<0.05$ versus basal). Este mismo efecto se observó en cultivos primarios de células endometriales estromales provenientes de pacientes controles y pacientes con EDT ($p<0.05$ versus basal). Por otra parte, la administración de WG (20mg/kg/día), AC (20mg/kg/día) y AR (3mg/kg/día) a ratones a los cuales se les indujo EDT quirúrgicamente resultó ser efectiva a la hora de disminuir el volumen de las lesiones desarrolladas ($p<0.05$ vs control). Sin embargo el número de lesiones no se vio reducido después de los tratamientos. Revalidando los resultados obtenidos in vitro, se observó una significativa disminución de la proliferación celular y un claro incremento del porcentaje de células apoptóticas en cortes histológicos de lesiones desarrolladas en animales tratados. A partir de estos resultados y conociendo que los compuestos naturales evaluados no provocan efectos secundarios indeseados, sugerimos considerar estas alternativas como terapéuticas promisorias para la EDT.

019 (434) UN AUMENTO TRANSITORIO DEL CALCIO INTRACELULAR INDUCIDO POR LA PROGESTERONA PROMUEVE LA EXOCITOSIS ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES DE RATÓN

Ana Romarowski[1]; Claudia Sánchez-Cárdenas[2]; Héctor Ramírez-Gómez[2]; Lis Del C. Puga Molina[1]; Claudia L. Treviño[2]; Arturo Hernández-Cruz[3]; Alberto I. Darszon[2]; Maríano G. Buffone[1]
Ibyme[1] Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cuernavaca, México.[2] Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México DF.[3]

Durante la capacitación los espermatozoides (EZs) adquieren la potencialidad de realizar reacción acrosomal (RA), un paso esencial en la fertilización. Se creía que este evento se producía tras la interacción del EZ con la zona pelúcida. Sin embargo, recientemente se demostró que los EZs de ratón realizan exocitosis antes de la interacción con la zona. La progesterona (Prog), producida por las células del cúmulus y de la granulosa, ha surgido entonces como un posible inductor fisiológico de la RA. Un aumento del Ca^2+ intracelular ($[Ca^2+]i$) es necesario para que ocurra la RA y, dado que la Prog lo promueve, se estudió la correlación espacio-temporal entre los cambios del $[Ca^2+]i$ y la RA en EZs de ratón en respuesta a este inductor. Se encontró que la Prog estimula un aumento del $[Ca^2+]i$ en un porcentaje significativo de EZs ($p<0,05$) en 5 patrones diferentes: aumento gradual, oscilatorio, transitorio tardío, transitorio inmediato y sostenido. Los dos últimos fueron los más frecuentes (31 y 30%, respectivamente). Se observó que el aumento del $[Ca^2+]i$ promovido por la Prog se inicia en diferentes regiones del EZ (flagelo o cabeza) y, mediante un análisis cinético local, se vio que la dirección de propagación más frecuente es la anterógrada. Se validó el uso de la sonda FM4-64 como un indicador de la RA en EZs de ratón detectando simultáneamente su fluorescencia y la pérdida de EGFP en EZs transgénicos EGFP-ACR. Por primera vez, se logró visualizar simultáneamente el aumento del $[Ca^2+]i$ y la exocitosis en respuesta a la Prog en EZs de ratón. El patrón de aumento del $[Ca^2+]i$ asociado con la RA fue un transitorio inmediato que se propaga en dirección retrógrada. En conclusión, aunque la Prog produce diferentes respuestas de Ca^2+ en los EZs de ratón, nuestras mediciones simultáneas permitieron conocer el patrón de Ca^2+ específico que determina el inicio de la RA.

020 (563) EXPRESIÓN DE LA ENZIMA 11BETA HIDROXILASA (CYP11B1) EN EL OVARIO BOVINO. IMPLICANCIAS DE LA SÍNTESIS LOCAL DE CORTISOL

Ayelen Noelia Amweg; Fernanda M. Rodríguez; Belkis E. Marelli; Florencia Rey; Natalia R. Salvetti; Hugo H. Ortega
Laboratorio De Biología Celular Y Molecular Aplicada ICIVET Litoral UNL-CONICET

En respuesta al estrés, la adrenocorticotropina (ACTH) actúa sobre la glándula adrenal estimulando la síntesis y secreción de glucocorticoides (GCs), hormonas esteroides que actúan sobre el metabolismo intermedio, la respuesta inmunitaria e inflamatoria y la reproducción. Basados en evidencias de nuestro grupo, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la expresión y actividad de la enzima 11-beta hiroxilasa (CYP11B1) en el ovario bovino. Se realizó la evaluación de la expresión génica de CYP11B1 por PCR en Tiempo Real en células de granulosa y teca de folículos terciarios pequeños, medianos y grandes de animales en proestro. Además, se generó un anticuerpo policlonal purificado por cromatografía de afinidad, específico para la enzima CYP11B1, y se utilizó

en western blot para confirmar la expresión proteica en muestras de pared folicular y de glándula adrenal. Además, se realizó un ensayo in vitro mediante cultivo de pared de folículos terciarios grandes, estimulados con ACTH en presencia de Metirapone, un inhibidor de la síntesis de GCs, para determinar la funcionalidad de CYP11B1. Se detectó la expresión génica de CYP11B1 en ambos tipos de células en los folículos analizados. Por western blot se obtuvo una banda a 48KDa, correspondiente a la enzima CYP11B1, confirmando la traducción del ARNm detectado por PCR. Por otro lado, se obtuvo una concentración aumentada de 17-hidroxiprogesterona y disminuida de cortisol en el medio de cultivo de las muestras estimuladas con Metirapone, indicando que la actividad de CYP11B1 estaría inhibida por el mismo. Estos resultados demuestran la presencia de la enzima CYP11B1 en el ovario bovino, confirmando que podría existir un mecanismo de acción directa del estrés a través de la síntesis local de GCs. Estas hormonas, a través de sus efectos antiinflamatorios, podrían estar implicadas en mecanismos reguladores relacionados con la ovulación, la esteroidogénesis ovárica y la función luteal.

021 (616) PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA ENDO- CANNABINOIDE EN LA REGRESIÓN INTRAGESTACIONAL DEL CUERPO LÚTEO DURANTE LA REABSORCIÓN EMBRIONARIA INDUCIDA POR LIPOPOLISACÁRIDO

Julieta Aylen Schander; Julieta Blanco; Cora Cymeryng; Mara Victoria Bariani; Julieta Aisemberg; Ana Paula Dominguez Rubio; Manuel Luis Wolfson; Ana Mara Franchi
CEFYBO

Entre las numerosas vías de señalización implicadas en la interfaz materno-fetal se encuentra el sistema endocannabinoide (SEC), que ha sido implicado en la fisiopatología de la preñez. En nuestro laboratorio desarrollamos un modelo murino de reabsorción embrionaria (RE) donde la administración de lipopolisacárido (LPS) produce un 100% de RE. Asociado a este proceso se observa niveles de progesterona (P) sérica disminuidos, aumento del óxido nítrico y las prostaglandinas uterinas y de los niveles plasmáticos de anandamida, el EC más abundante en el sistema reproductivo. El objetivo del presente trabajo es estudiar si el SEC participa de la RE inducida por LPS. Para ello se suministró LPS (0,5 µg/g de peso) a ratones wild type (WT) y knockout para el receptor de cannabinoides de tipo 1 (KO). Esta dosis produce mayores porcentajes de RE en los animales WT (69,4±22,0%) que en los KO (3,4±1,4%) y una mayor disminución en la P circulante en animales WT (61%) que en los KO (42%). En roedores, el cuerpo lúteo (CL) es el encargado de mantener los niveles de P durante toda la preñez y su función se regula principalmente por la prolactina (PRL) y la prostaglandina F2 α (PGF2 α) uterina. Por ello cuantificamos los niveles de prostaglandina F2α uterinos, y la expresión del mensajero y la proteína COX-2, principal enzima encargada de su síntesis. Todos los parámetros se vieron aumentados en animales WT tratados con LPS pero no en los KO ($p<0,05$). Por otro lado la expresión del mensajero del receptor de PRL disminuyó por el tratamiento con LPS en animales WT y no en los KO ($p<0,05$). Asimismo se observó mayor cantidad de CL en regresión, 48h post tratamiento con LPS, en animales WT que en los KO. Estos resultados evidencian que el SEC está involucrado en procesos asociados al mantenimiento de la preñez y que su desregulación inducida por LPS está influenciada por alteraciones en el sistema endócrino.

NEUROCIENCIAS 1

022 (15) HMGB-1 Y LOS RECEPTORES TOLL-LIKE (TLR2 Y TLR4) PARTICIPAN EN LA SOBREVIDA NEURONAL A TRAVÉS DE FACTORES SOLUBLES ASTROGLIALES

Gerardo Ariel Rosciszewski; Jeronimo Lukin; Vanesa Cadena; Veronica Murta; Alberto Javier Ramos
IBCN

Luego de un daño isquémico cerebral, la difusión de mediadores tipo DAMP (Damage Associated Molecular Pattern) como HMGB-1 produce la activación de la inmunidad innata, que está mediada por astrocitos, microglía y células infiltrantes de la periferia (BIC). Esta interacción determina la gliosis reactiva, que puede ser benéfica para la sobrevida neuronal o generar un entorno proinflamatorio neurodegenerativo. Para estudiar la participación de HMGB-1 y sus receptores TLR2 y TLR4 en la gliosis reactiva y sus efectos en la sobrevida neuronal, utilizamos animales sometidos a isquemia focal por devascularización cortical y cultivos primarios astrogliales, microgliales o neuronales. La isquemia cerebral in vivo o la exposición a deprivación de oxigeno y glucosa in vitro indujeron la expresión de TLR2 y TLR4. El tratamiento de los cultivos con diferentes dosis de HMGB-1 (50-500 ng/ml) mostró la activación de NF-KB y la gliosis reactiva, aunque la expresión de genes por RT-PCR evidenció un perfil antiinflamatorio glial. Los medios condicionados por astrocitos expuestos a HMGB-1 fueron capaces de convertir a la microglia al fenotipo M2 (antiinflamatorio), de acuerdo al perfil de expresión de iNOS, TGFbeta, TREM-2, IL1B, IL6, y facilitar la sobrevida de neuronas corticales analizada por MTT, un efecto parcialmente atenuado por el uso del inhibidor específico de TLR2 y TLR4 (VGX-1027). En concordancia con estos resultados, la exposición a los medios condicionados por astrocitos tratados con HMGB-1 indujo un incremento en la sinaptogénesis analizada a través de la abundancia de puncta sinápticos por neurona. Nuestros resultados indican que la exposición a HMGB-1 induce gliosis reactiva en un perfil que facilita la sobrevida neuronal y convierte a la microglia hacia el fenotipo antiinflamatorio M2, demostrando que el contexto celular y la secreción de mediadores solubles es clave para determinar los efectos pro-sobrevida o detrimentales de la gliosis reactiva. Subsidios: PICT 2012-1424, UBACYT

023 (227) DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE NEURONALES INDUCIDA POR LÍPIDOS

Aneley N. Montaner; Javier Girardini; Claudia Banchio
IBR

Las células madre neuronales (NSCs) tienen el potencial de generar todos los tipos celulares presentes en el Sistema Nervioso Central. En el organismo adulto existen NSCs que se activan para regenerar el tejido nervioso ante un daño traumático o patológico, sin embargo, esta capacidad es parcial ya que el tejido no logra repararse completamente. Resulta por ello importante identificar moléculas capaces de potenciar el proceso de diferenciación de NSCs. Como objetivo proponemos analizar el rol de lípidos, particularmente Fosfatidilcolina (PC) y Fosfatidiletanolamina (PE) como moléculas de señalización capaces de regular la diferenciación de NSCs. Como modelo de estudio utilizamos NSCs aisladas de la corteza de cerebros de embriones de ratón de 13 días de gestación y propagadas en cultivos de neuroesferas. Para el análisis de diferenciación, las células fueron tratadas con PC (50µM) y PE (50µM), e incubadas durante 3 días. La identidad celular se analizó por técnicas de inmunofluorescencia utilizando marcadores específicos de neuronas (β-III tubulina), astrocitos (GFAP), oligodendrocitos (Olig2) y progenitores (Nestina). El análisis cuantitativo demostró que el agregado de PC provoca un aumento significativo en el número de células que expresan β-III tubulina mientras que PE induce un aumento en células GFAP positivas (T de Student, $p<0.05$). Utilizando la técnica de microscopía de lapso de tiempo, pudimos determinar que el número de células en activa división (proliferación de progenitores), el modo de división celular (mediante la construcción de árboles filogenéticos) y la supervivencia no se modifica al agregar PC o PE respecto a la condición control. Estos resultados sugieren que cada fosfolípido ejerce un efecto inductor de la diferenciación de NSC hacia un determinado linaje el cual es independiente de la proliferación celular y de la supervivencia.

024 (288) CAMBIOS DE LA NEUROESTEROIDOGE- NESIS EN LA ENCEFALITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PROGESTERONA (PROG)

Laura Inés Garay[12]; Paula Gonzlez Giqueaux[1]; M Claudia Gonzalez Deniselle[12]; A.F De Nicola[12]
IBYME-CONICET[1] Fac Medicina-UBA[2]

La encefalitis autoimmune experimental (EAE) es el modelo más aceptado de Esclerosis Múltiple (EM). Diversas evidencias sugieren un rol de las hormonas esteroides en la incidencia, progresión y severidad de la EM. Previamente describimos efectos beneficiosos de la PROG en la EAE. El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión del ARNm de proteínas y enzimas esteroidogénicas involucradas en la síntesis de PROG y estrógenos en la médula espinal de animales EAE así como el efecto del tratamiento con PROG en la expresión de las mismas. Se analizaron por qPCR los ARNm para: la proteína regulatoria de la esteroidogénesis aguda (StAR), la proteína translocadora TSPO,y el canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC) en ratones EAE y controles. Además, se estudió la expresión genética de las enzimas 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3βHSD), 5α-reductasa (5αR) y aromatasa (ARO). Los EAE mostraron una significativa disminución de las proteínas StAR, VDAC, 5αR y ARO mientras que aumentó la expresión de TSPO, sin cambios en la 3βHSD. El tratamiento con PROG (pellet s.c 100mg) fue capaz de revertir estas alteraciones. Así, se observó un aumento significativo del ARNm para StAR (veces de aumento: CTRL:1.01 ± 0.061, EAE: 0.60 ± 0.09, EAE+PROG: 0.95 ± 0.07;p=0.01) y VDAC (CTRL:1.05 ± 0.28, EAE: 0.22 ± 0.02, EAE+PROG:0.91± 0.14; p=0.03), mientras que TSPO disminuyó (CTRL:1.00 ± 0.05,EAE:5.88 ± 1.18, EAE+PROG: 3.14 ± 0.86;p=0.06). En agregado, PROG incrementó la expresión de 5αR (CTRL:1.00 ± 0.04, EAE: 0.39 ± 0.05, EAE+PROG: 1.02± 0.096; p<0.0001) mientras que no modificó la 3βHSD. Conclusión: los ratones EAE presentaron deficiencias en la expresión de enzimas neuroesteroidogénicas, en coincidencia con una mayor severidad de síntomas clínicos, mientras que el tratamiento con PROG normalizó significativamente estas alteraciones. Estas acciones junto a su efecto neuroprotector y antiinflamatorio, posicionan a este esteroide como una alternativa terapéutica en la EM.

025 (293) LA NESTORONA, UN AGONISTA DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA, PREVIENE LA INFLAMACIÓN Y NEURODEGENERACION EN UN MODELO ANIMAL DE LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTROFICA

María Meyer[1]; María Claudia Gonzalez Deniselle[12]; Laura Garay[12]; Regine Sitruk-Ware[3]; Rachida Guennoun[4]; Michael Schumacher[4]; Alejandro Federico De Nicola[12]
IBYME[1] Facultad de Medicina, UBA[2] The Population Council and Rockefeller University, New York[3] Inserm and Université Paris-Sud, France[4]

El ratón Wobbler (Wr) presenta degeneración de motoneuronas espinales, astrogliosis y microgliosis. Para prevenir estas anormalidades, empleamos Nestorona, un superagonista del receptor de progesterona empleado en contracepción pero que también posee propiedades neuroprotectoras en modelos de isquemia cerebral y desmielinización. Wr genotipificados de 5 meses de edad (wr/wr) recibieron s.c 200 mg/día/ratón de Nestorona en aceite de ricino por 10 días o vehículo solamente. Ratones controles (Ctl) NFR/NFR recibieron solo vehiculo. Los Wr sin tratamiento (Tto) presentaron anormalidades de la médula espinal, tales como motoneuronas vacuoladas, disminución de la inmunoreactividad para la colina-acetiltransferasa, disminución de la glutamina sintetasa, aumento de la proteína ácida fibrilar de la glía (astrocitos GFAP+) y alteraciones en los estadios clínicos de la enfermedad (manos atrofiadas y dedos en flexión). El tratamiento con Nestorona en Wr retrasó la progresión de estas alteraciones. Además, los Wr no tratados expresaron microgliosis Iba1+ (p<0.001 vs Ctl), altos niveles del ARNm para CD11b, marcador de microglia, (p<0.05 vs Ctl) y aumento del ARNm de los marcadores proinflamatorios TNFa (p<0.001 vs Ctl) e iNOS (p<0.01 vs Ctl). Estos parámetros se normalizaron en los Wr+Nestorona (Iba1+:p<0.001 vs. Wr sin Tto; CD11b:p<0.01; TNFa:p<0.01; iNOS:p<0.01). El ARNm para NFkB aumentó en la médula espinal de los Wr sin Tto (p<0.05 vs Ctl) y disminuyó con Nestorona (p<0.05 vs Wr sin Tto). La expresión del ARNm para su inhibidor IkBa aumentó en los Wr Nestorona vs. Ctl y Wr sin Tto (p<0.05 vs Ctl; p<0.05 vs. Wr sin Tto). Conclusiones: (a) la neuroinflamación jugaria un papel importante en la neurodegeneración; (b) la Nestorona antagoniza los mediadores proinflamatorios y previene el desarrollo de microgliosis y astrogliosis frenando la neuropatología de la médula espinal del Wr.

026 (385) EFECTO DEL HIPERTIROIDISMO SOBRE LA EXPRESIÓN HIPOTALÁMICA DE LOS MIEMBROS DE LA CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE PRL EN RATAS LACTANDO

Gisela E. Pennacchio[1]; Marta Soaje[13]; Graciela A. Jahn[1]; Susana R. Valdez[12]
IMBECU[1] Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNCuyo[2] Facultad de Ciencias Médicas, UNCuyo[3]

El hipertiroidismo (HiperT) produce bloqueo parcial de la eyección láctea en ratas lactando, que podrían resultar del desbalance en la actividad dopaminérgica hipotalámica. La dopamina es el principal regulador tónico-inhibitorio de la secreción de PRL y la tirosina hidroxilasa (TH) limita su biosíntesis. La expresión de TH es estimulada por PRL, por un mecanismo de retrocontrol corto que regula su propia secreción. Estudiaremos los efectos del HiperT sobre la expresión de los principales miembros de la cascada de señalización de PRL en hipotálamo medio basal (HMB) en ratas en lactancia establecida. Se usaron ratas Wistar controles (Co) e HiperT en el día 12 de lactancia (L12) sacrificadas a las 16 hs. El HiperT se indujo por inyección de T4 0.25 mg/kg/día s.c. hasta el día 18 de gestación y luego de T4 0,1 mg/kg/día s.c. Ratas Co e HiperT se separaron de sus crías durante 8h (S) y otros grupos fueron separadas por 8 h y luego se repusieron las crías durante 30 minutos (succión aguda: Scs). Se disecó el HMB y por Western blot se determinó la expresión de TH fosforilada (p-TH), Stat5b y CIS respecto a tubulina. La leche obtenida se determinó por la diferencia de peso de la camada antes y luego de la succión. La ganancia de peso en las Co fue 7,35 ± 1,35 g por camada de 8 crías luego de la succión mientras que en las HiperT fue 1,58 ± 0,48 g (p< 0.001). La expresión del activador Stat5b aumentó solo en las HiperT Scs (p<0.01 vs HiperT S). Para CIS, una proteina inhibidora de la vía, se observó aumento solo en las Co Scs (p<0.05 vs Co S). La pTH aumentó su expresión proteica en las Co Scs (p<0.001 vs Co S) y menos en las HiperT (p<0.05 vs HiperT S). En conclusión, en ratas HiperT, en respuesta al estímulo de la succión y/ó niveles elevados de PRL se induce la expresión del activador Stat5b y no induce la del modulador negativo CIS, sugiriendo una reactividad elevada de la vía de PRL en las neuronas hipotalámicas dopaminérgicas, lo que comprometería la lactancia.

027 (630) LA CONDUCTA SOCIAL Y EL BALANCE NCAM/PSA-NCAM COMO BLANCOS DE ACCIÓN DE LA FLUOXETINA

Martín Gabriel Codagnone[12]; Nonthué Alejandra Uccelli[1]; María Fernanda Podestá[12]; Maríanela Evelyn Traetta[12]; Analía Reinés[12]
IBCN[1] Cátedra de Farmacología, Fac. de Farmacia y BioQuímica-Univ. de Buenos Aires[2]

Los trastornos del espectro autista (TEA) son desordenes del neurodesarrollo caracterizados por alteraciones en la comunicación verbal y no verbal, un déficit en la interacción social y la presencia de conductas repetitivas y estereotipadas. De etiología desconocida, los TEA se presentan como un complejo entramado de factores genéticos y ambientales que modifican la funcionalidad sináptica. La ausencia de tratamiento específico reclama la identificación de nuevos blancos moleculares. En este contexto, la molécula de adhesión celular neuronal (NCAM) emerge como un candidato potencial. En el modelo de TEA por administración de ácido valproico (VPA) durante la gestación, describimos un aumento de NCAM y un descenso de su forma polisialilada (PSA-NCAM) en áreas relevantes para la patología como la corteza prefrontal medial (mPFC) y el hipocampo. Por su potencial para inducir remodelado sináptico, en el presente trabajo estudiamos el balance NCAN/PSA-NCAM y las conductas nucleares de los TEA como blancos de acción de la fluoxetina (F). Los animales que recibieron VPA o solución fisiológica (C) durante la gestación se trataron con 10 mg/kg (sc) de fluoxetina (C-F, VPA-F) o solución salina (CS, VPA-S) entre los días postnatales 16-30. En los animales VPA, la F corrigió las conductas repetitivas-estereotipadas,

previno el déficit exploratorio, normalizó la exploración social y ejerció beneficios parciales sobre la conducta social de juego. Mientras que en la mPFC la F corrigió el desbalance NCAM/PSA-NCAM sin alterar los niveles anormalmente aumentados del marcador sináptico sinaptofisina (SIN), en el hipocampo no modificó dicho balanceaunque incrementó dramáticamente los niveles de SIN. Los resultados indican beneficios de la F sobre las conductas nucleares de los TEA y señalan al balance NCAM/PSA-NCAM y al remodelado sináptico como blanco de acción del fármaco en la mPFC y el hipocampo, respectivamente.

MEDICINA REGENERATIVA Y TERAPIA CELULAR

028 (9) REPROGRAMACIÓN CELULAR MEDIADA POR IPSC O POR INTERMEDIARIOS NO PLURIPOTENTES PARA LA GENERACIÓN DE CARDIOMIOCITOS

Micaela Lopez Leon[1]; Maríanne Lehmann[1]; Santiago Haase[2]; Regina Coeli Dos Santos Goldenberg[3]; Vctor Romanowski[2]; Rodolfo G. Goya[1]
INIBIOLP, Facultad de Medicina, UNLP[1] IBBM, UNLP[2] UFRJ, Rio de Janeiro[3]

La obtención de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) constituye un logro de enorme potencial clínico ya que las iPSC pueden diferenciarse a estirpes celulares de interés clínico. En tal sentido la generación de cardiomiocitos (CM) a partir de iPSC derivadas del propio paciente resulta de gran interés para el tratamiento del infarto de miocardio. En el presente estudio establecimos un protocolo de diferenciación de iPSC a CM. Inicialmente se generaron iPSC humanas a partir de cultivos de eritroblastos de sangre periférica que fueron transducidos con cuatro vectores derivados del Sendai virus, cada uno portando uno de los genes de pluripotencia sox2, c-myc, klf4 y oct4 (genes de Yamanaka). Quince días después de la transducción se observaron colonias de iPSC que se aislaron, expandieron y caracterizaron por citometría de flujo para analizar la presencia de marcadores de superficie celular y factores de transcripción propios de iPSC, y por RT-PCR, para identificar la expresión endógena y exógena de genes específicos de iPSC. Una vez establecidas las líneas de iPSC, se buscó poner a punto un protocolo para diferenciarlas a CM. Se emplearon diferentes combinaciones de factores de diferenciación en los medios de inducción a mesodermo temprano y a progenitores cardíacos, encontrándose que la combinación óptima es la de Activina A/BMP4 (día 1); XAV (día 4). Este protocolo de diferenciación se utilizará como base para establecer una estrategia de reprogramación directa a CM mediada por los cuatro genes de pluripotencia arriba mencionados, que se basa en la construcción y utilización de un plásmido regulable que expresa los 4 genes de Yamanaka y el gen de la GFP. Dicho plásmido permite la generación de fibroblastos epigenéticamente inestables (EI) que pueden diferenciarse a CM. Se describirá nuestro avance en este proyecto. La reprogramación mediada por intermediarios EI es un método promisorio por su relativa sencillez y costo moderado.

029 (185) ACTIVACIÓN DEL GEN ENDÓGENO DE INSULINA HUMANA (INS) MEDIANTE EL USO DEL SISTEMA CRISPR-ON

Carla A Giménez[1]; Marcelo Ielpi[1]; Adrian Mutto[2]; Luis Grosembacher[3]; Pablo Argibay[1]; Federico Pereyra Bonnet[1]
ICBME, Instituto Universitario del Hospital italiano[1] Laboratorio de Biotecnología Aplicada a la Reproducción Animal, IIBINTECH, UNSAM-CONICET[2] Servicio de Endocrinología y Medicina Nuclear del Hospital Italiano de Buenos Aires[3]

El sistema CRISPR-on es un nuevo y poderoso sistema de activación transcripcional dirigido y puntual. El sistema consiste en una nucleasa inactivada (dCas9) fusionada a dominios de activación (VP160) y ARN guías (gARNs), que co-expresados en un vector forman un complejo que reconoce una secuencia blanco y activa un gen específico. Nuestro objetivo fue activar la expresión del gen endógeno de INS humana mediante el uso del sistema CRISPR-on. Para ello se diseñaron y clonaron en el vector guía (Addgene #47108) 4 gARNs que hibridan con el promotor proximal de INS. Los gARNs fueron co-transfectados con el vector activador (Addgene#48226) en células HEK293T. Mediante RT-PCR y RT-qPCR demostramos que nuestro sistema CRISPR-on activó el gen INS y que el uso en conjunto de los 4 gARNs tuvo un efecto sinérgico comparado con el uso de gARNs individuales ($P<0.05$). Asimismo, en un ensayo de dinámica de expresión se observó que el efecto activador se mantiene durante 30d. Mediante PCR-bisulfito seguida de secuenciación, observamos que el promotor de INS se mantuvo hipermetilado inclusive luego de su activación. Sin embargo, mediante el análisis de ChiP observamos un incremento en los niveles de H3K9ac, una marca epigenética relacionada con la activación. Finalmente, debido a su potencial uso terapéutico, demostramos que el sistema CRISPR-on, también activó la expresión del gen de INS en dos líneas in vitro de fibroblastos de pacientes con diabetes tipo 1. En conclusión, nuestros resultados demuestran que CRISPR-on puede utilizarse para activar el gen de INS humana y que la utilización de varios gARNs aumenta su eficiencia. Asimismo, nuestros resultados sugieren que CRISPR-on actúa en forma independiente del estado de metilación del promotor y modifica la acetilación en Histonas. El sistema CRISPR-on es una novedosa herramienta para el análisis de las funciones génicas, las técnicas de reprogramación celular y en última instancia para futuros ensayos de Terapia Epigenética.

030 (262) DETERMINACIÓN DEL MIRNOMA INVO- LUCRADO EN LA DIFERENCIACIÓN A MESODERMO Y A CARDIOMIOCITOS A PARTIR DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES HUMANAS

Ximena Garate[1]; Leonardo Romorini[1]; Gabriel Neiman[1]; Natalia Lucia Santin[1]; Fernanda Mesquita[12]; Carlos Luzzani[1]; Gustavo Sevlever[1]; Santiago Miriuka[1]
Fundación para la Lucha contra las enfermedades Neurologicas de la Infancia[1] Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro – RJ – Brazil[2]

Las células madre pluripotentes tienen la capacidad de diferenciarse a casi todos los tejidos adultos (ecto, meso y endodermo). En los últimos años se ha comenzado a estudiar el rol que cumplen los microARNs como reguladores clave de la expresión génica en diversos procesos biológicos, como por ejemplo durante la diferenciación celular. En el presente trabajo nos proponemos identificar qué microARNs (nuevos y conocidos) participan en la diferenciación a mesodermo y hacia el linaje cardíaco a partir de células madre pluripotentes (CMP) humanas. Mediante la secuenciación masiva de los pequeños ARNs (RNAseq) y qPCR estudiamos el perfil de expresión de los microARNs en las siguientes poblaciones: células indiferenciadas, progenitores de mesodermo temprano y en cardiomiocitos inmaduros. A partir del análisis bioinformático identificamos 3 grupos de microARNs que se expresan diferencialmente en cada una de las poblaciones. Entre ellos, encontramos un gran cluster de microARNs localizados en el cromosoma 19, llamado C19MC. Realizamos un análisis bioinformático de este cluster y encontramos genes targets que regulan el ciclo celular y la transición epitelio mesenquimal, entre otras funciones relevantes en las CMP. Una gran parte de los microARNs que pertenecen a dicho cluster poseen un alto nivel de expresión en las células indiferenciadas, y luego caen en la población del progenitor de mesodermo temprano y se mantienen bajos en los cardiomiocitos. Encontramos además que, microARNs de la familia miR-371 ubicados en cercanías de este cluster comparten varios genes target y se regulan de manera similar. En conclusión, describimos en este trabajo la expresión de los microARNs que regulan la diferenciación mesodérmica y cardíaca, particularmente los contenidos en el C19MC.

031 (295) FRACCIÓN ESTROMAL VASCULAR DE TEJIDO ADIPOSO Y PLASMA RICO EN PLAQUETAS EN MEDICINA REGENERATIVA: EFECTO SOBRE LA CICATRIZACIÓN DE LESIONES CUTÁNEAS

Santa María, Victoria; Vidal, Luciano; Di Ciano, Luis Alberto; Gonzales Mansilla, Noelia Luz; Paz, Leonardo Agustín;

De Vito, Eduardo Luis; Goette, Nora Paula; Azurmendi, Pablo Javier
IDIM

La inadecuada cicatrización de heridas puede comprometer el estado clínico del individuo. Las células de la fracción estromal vascular (FEV) de tejido adiposo poseen capacidad proliferativa y de diferenciación multilinage, mientras que el plasma rico en plaquetas (PRP) promueve la proliferación celular, la angiogénesis y el depósito de colágeno. El efecto de FEV y/o PRP sobre la cicatrización de heridas cutáneas es aún materia de debate. Para evaluar la utilización de FEV, PRP y su asociación en la reparación de heridas cutáneas se utilizaron 15 ratas Wistar macho adultas con 2 heridas de 1cm2 en el dorso. Una herida se trató con FEV, con PRP o con FEV+PRP (según grupo) y la contralateral con sol. Ringer lactato. El FEV se extrajo de grasa inguinal autóloga por digestión con colagenasa I y el PRP por centrifugación controlada de sangre con citrato obtenida de la arteria facial. Se midió el tiempo de cerrado de la herida y se analizaron sus características histológicas a los 15 y 30 días posteriores al cierre completo. FEV mostró efectividad sobre la cicatrización, acelerando el cierre completo respecto de la herida control (13.6±1.0 vs 15,6±0.7 días, $p<0.05$) y se observó una tendencia en FEV+PRP (13.5±1.0 vs 15.5±1.9). Se demostró la capacidad pluripotencial y proliferativa de las células del FEV por obtención de células fibroblastoideas en cultivo, capaces de diferenciar a tejido adiposo y cartílago (coloraciones de Oil Red y Alcian Blue). El tratamiento con FEV mejoró la recomposición de la histoarquitectura respecto del PRP: mayor densidad vascular a los 15 días y menor a los 30 ($p=0.036$ y $p=0.009$); más pliegues ($p=0,02$) y dermis más gruesa a los 30 días ($p=0,03$). En este modelo, el FEV disminuyó el tiempo de cicatrización y mejoró la calidad de la cicatriz, mientras que el uso de PRP - solo ó asociado a FEV - no mostró efecto beneficioso. El tratamiento con FEV podría mejorar el proceso de cicatrización de heridas.

032 (465) CARACTERIZACIÓN DE EXOSOMAS AISLADOS DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES Y CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE PLURIPOTEN- TES

Carlos Luzzani[1]; Lucia Moro[1]; Ximena Garate[1]; Gabriel Neiman[1]; Leonardo Romorini[1]; Marcela Garcia[2]; Ana Lia Errecalde[2]; Gustavo Sevlever[1]; Santiago Miriuka[1]
LIAN - CONICET, FLENI[1] Cátedra de Citología, Histología y Embriología "A", Depto de Cs. Morfológicas, F. Cs. Médicas, UNLP[2]

Los exosomas son vesículas de entre 100-150 nm secretadas por diversos tipos celulares que constituyen una forma de comunicación entre las células. El objetivo de este trabajo fue caracterizar los exosomas de Células Madre Pluripotentes (CMP) y Células Madre Mesenquimales derivadas de CMP (CMM-DP), no descriptos hasta el momento. Encontramos que tanto las CMP como las CMM-DP expresan marcadores exosomales en su membrana (CD9 y CD81) en niveles similares a las CMM de cordón umbilical (CMM-CU). No obstante, los exosomas de CMP presentan menos CD9 y CD81 que los de CMM-CU. Por otra parte, analizamos el perfil de integrinas de los exosomas de CMP y CMM-DP ya que los exosomas de CMM-CU suelen presentar estas proteinas en su membrana. Se determinó que en ambos casos el perfil de integrinas de los exosomas difiere del de las células que les dieron origen. Mediante qPCR se encontró también que los exosomas de CMP son ricos en mRNA de OCT4 y NANOG, y en micro RNAs característicos de células pluripotentes (miR205 y la familia del miR302), comparados con los de CMM. Además,analizamos los niveles de mRNA de otros genes como TGF-b, IL-6, PD-1 y PDL-1, moléculas relacionadas con la capacidad inmunomoduladora de CMM-CU y CMM-DP; y los niveles de miR145, característicos de diferenciación celular. Por último, estudiamos la cinética de entrada de los exosomas de CMP-CU marcándolos con un colorante fluorescente y comprobamos, por qPCR, que los mismos son capaces de introducir mRNA de OCT4 y NANOG en fibroblastos. En conclusión, los exosomas de CMP difieren de los de CMM-DP y de los de CMM-CU en sus marcadores de membrana, incluyendo los marcadores típicos, CD9 y CD81. Además contienen mRNA de OCT4, NANOG y TGF-b en concentraciones similares a las encontradas en el citoplasma de CMP. Finalmente, los exosomas de CMP son capaces de introducir mRNA endógenos en células diferenciadas, sugiriendo que estas vesículas son importantes moduladores parácrinos de la respuesta celular.

033 (479) LA EXPRESIÓN DE SOD2 ES REGULADA POR OCT4 Y NANOG, FACTORES DE TRANSCRIPCION ESENCIALES EN CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES

Claudia M Solari[1]; María Victoria Petrone[1]; Camila Vazquez Echegaray[1]; Soledad Cosentino[1]; Ariel Waisman[1]; Marcos Francia[1]; Emilly Villodre[2]; Guido Lenz[2]; Santiago Miriuka[3]; Lino Barañao[1]; Alejandra Guberman[1]
IQUIBICEN,CONICET-UBA; Dpto. Química BIOLOGICA, FCEN,UBA[1] Lab. de Sinalização Celular - Dpto. de Biofísica Universidade Federal do Rio Grande do Sul[2] LIAN, FLENI[3]

Los factores de transcripción (FT) Oct4, Sox2 y Nanog son esenciales en el mantenimiento de las propiedades funcionales de las células madre pluripotentes (CMP), autorrenovación y pluripotencia. Las células madre embrionarias (CME) y las pluripotentes inducidas (CMPI) poseen un complejo sistema de defensa frente al estrés oxidativo, que entre otras funciones, asegura la estabilidad genómica, que es crítica para su rol en el desarrollo. Bajo la hipótesis de que estos FT regulan la expresión de genes involucrados en diversos mecanismos celulares, como los implicados en la defensa frente al estrés oxidativo, estudiamos la modulación de la expresión de algunos de estos genes en el estado indiferenciado y en la diferenciación. En este trabajo analizamos en particular la regulación del gen Sod2. Mediante RT-qPCR, previamente observamos que su expresión disminuyó a lo largo de distintos protocolos de diferenciación, tanto en líneas de CME, Ainv15 y R1, como en CMPI. Asimismo, los FT también redujeron su expresión. Luego, generamos dos vectores reporteros pSod2.1-Luc y pSod2.2-Luc, mediante el clonado de dos fragmentos que abarcan distintas regiones del promotor de Sod2, río arriba del gen de Luciferasa. Realizamos ensayos de trans-activación en una línea celular de fibroblastos, cotransfectando estas construcciones con vectores de expresión de Oct4 y Nanog, y observamos que la actividad del promotor de Sod2 es inducida por dichos FT en ambas construcciones. Finalmente, analizamos mediante RT-qPCR la modulación de la expresión de Sod2 en CME R1 que fueron transfectadas con vectores que codifican para short hairpin RNA dirigidos contra Oct4 y Nanog. Encontramos una disminución en la expresión del gen en estudio en las condiciones de reducción de mRNA de estos FT. Creemos que un mayor entendimiento de esta regulación contribuirá a la comprensión de los mecanismos moleculares relevantes en el mantenimiento de las propiedades fundamentales y la integridad de su genoma.

034 (514) LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MA- DRE EMBRIONARIAS ES REPRIMIDA POR LA INHIBICIÓN DE LA REPLICACIÓN DEL ADN E INFLUENCIADA POR LA DIVISIÓN CELULAR

Ariel Waisman[1]; Camila Vazquez Echegaray[1]; Soledad Cosentino[1]; Claudia María Solari[1]; Lino Barañao[1]; Ali Brivanlou[2]; Alejandra Guberman[1]
Fac.de Cs..Exactas, Universidad de Buenos Aires[1] Universidad Rockefeller[2]

Las células madre embrionarias (CME) pueden cultivarse indefinidamente in vitro manteniendo su pluripotencia, es decir, la capacidad de generar todos los tipos celulares del organismo adulto. Estas células, que se asemejan a células del epiblasto del embrión preimplantatorio, pueden rápidamente dar lugar a células similares a un estadio posterior en el desarrollo, el epiblasto postimplantatorio (EpiLCs). Esta transición, que ocurre en tan sólo 24-48 horas, ocurre concomitantemente con un cambio sustancial de los programas transcripcionales (PTs), con genes de pluripotencia naïve disminuyendo su expresión, y genes marcadores de EpiLCs siendo regulados positivamente. En este trabajo decidimos

estudiar los posibles mecanismos que regulan la transición entre las CME y EpiLCs, bajo la hipótesis de que procesos como la replicación del ADN y la división celular podrían ser importantes en el cambio de PTs. Mediante el uso del sistema reportero de ciclo celular FUCCI y análisis de microscopía por tiempo prolongado, estudiamos el ciclo celular de CME. Encontramos una llamativa correlación entre la duración del ciclo total entre células hermanas, la cual fue notablemente mayor cuando analizamos la duración de la fase G1. Luego, generamos cultivos de CME sincrónicos aprovechando las propiedades del sistema FUCCI y, mediante análisis de la expresión génica por RT-qPCR, observamos que la transición de PTs entre CME y EpiLC comienza en la misma generación celular que recibe la señal. Algunos genes, sin embargo, parecen requerir el pasaje a través de mitosis para poder modificar su actividad transcripcional. Notablemente, cuando inhibimos la replicación del ADN observamos un bloqueo en la capacidad de las células para modificar la expresión de genes en la transición hacia EpiLCs. Descifrar los mecanismos que regulan estos procesos podría ser muy importante para entender la regulación del cambio entre PTs en la diferenciación de CM pluripotentes.

PRESENTACIONES DE POSTERS

INFECTOLOGÍA, INFLAMACIÓN E INMUNOLOGÍA 1

035 (68) ESTUDIO DE PREVALENCIA DE LA VARIABILIDAD CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS CON OTRAS PATOLOGÍAS ASOCIADAS

Bruno Selva[1]; Romina Blasco[2]; Noemi Miler[1]; Silvina Lo Presti[2]; Daniela Velazquez[1]; Patricia Paglini[2]; H. Walter Rivarola[2]
Univ. Nac. de Cordoba Fac. de Cs. Médicas[1] INICSA[2]

La Enfermedad de Chagas (ECH) es un problema de salud pública. Aun no se explica completamente por qué el 30% de las personas infectadas evolucionan hacia una enfermedad cardíaca y el 70% permanece asintomático aunque con serología persistente; como tampoco la amplia variabilidad clínica.Los objetivos fueron: verificar la persistencia del T. cruzi en la fase crónica de la ECH, cuantificar la prevalencia de HTA, diabetes (DBT), alteraciones cardíacas y sintomatología en pacientes chagasicos (CH) y no chagasicos(NCH) y comprobar la sinergia entre los factores de riesgo (HTA, DBT, etc) y la ECH.Se obtuvieron muestras desangre de 67 pacientes que se clasificaron en: serología + o – para ECH: sin cardiopatía, con cardiopatía leve o severa.Serología + o - para ECH: con y sin signos sugestivos para miocardiopatía. Se correlacionaron sus antecedentes patológicos personales y síntomas en relación a su serología. Resultados: Serología: 44,8% (+) y 55,2% (-). El 50% con serología + son hipertensos, NCH un 48,6%. La prevalencia de diabéticos (DBT) con serología (-) es casi el doble que en los CH. En los CH e hipertensos (HTA) se detectó en sangre ADN de T. cruzi en un número significativamente mayor que en los individuos CH y sin HTA. Las alteraciones cardíacas en los pacientes con serología + fueron significativamente superioresque las encontradas en los individuos con serología (-). Solamente encontramos miocardiopatía dilatada en individuos CH. Un 40% de los CH con sugestiva miocardiopatía poseen niveles de títulos de anticuerpos altos. Los CH con PCR positiva (+) presentaron sintomatología moderada y severa, y los CH con PCR negativa (-)solamente evidenciaron sintomatología moderada. Conclusión: La sinergia de distintas patologías como la HTA, la DBT o la misma cardiopatía chagásica sumado a la presencia del T. cruzi en sus diferentes variantes podrían estar explicando la variabilidad clínica que presentan los CH.

036 (114) EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE Y PERSIS- TENCIA BACTERIANA IN VIVO LUEGO DE LA INFECCIÓN INTRAMAMaría CON DOS CEPAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN UN MODELO MURINO

Elizabet A.L Pereyra[1]; C.S Andreotti[1]; C Baravalle[1]; M.S Renna[1]; A Dure[1]; L.F Calvinho[2]; B.E Dallard[1]
Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral ICIVET-Litoral UNL-CONICET[1] EEA Rafaela, INTA[2]

El objetivo del trabajo fue evaluar y cuantificar componentes de la respuesta inmune innata (monocitos/macrófagos-MM) y adaptativa (linfocitos T CD4+ y CD8+ y linfocitos B) y la persistencia bacteriana in vivo luego de la inoculación intramaMaría (IM) de dos cepas de Staphylococcus aureus, de origen bovino con características genéticas y epidemiológicas diferenciales en un modelo murino. La cepa A, aislada solo una vez durante la lactancia a partir de un animal con infección intramaMaría (IIM) clínica (cepa no persistente) y la cepa B de un animal con IIM crónica aislada durante toda la lactancia (cepa persistente). Se utilizaron 3 grupos de ratones en lactancia que fueron inoculados en forma IM con las cepas A, B y solución fisiológica (control). Los ratones fueron sacrificados a diferentes tiempos, desde las 6 hs hasta 264 hs post inoculación (pi). La identificación de las células inmunes se realizó por inmunohistoquímica. Además, se evaluó la persistencia in vivo de las cepas A y B luego de la IIM, donde se obtuvieron los valores promedios de log UFC/glándulas disgregadas. La cepa A, en comparación con la B, estimuló un mayor reclutamiento de MM, linfocitos T y B a la glándula maMaría (GM) hasta las 96 hs pi ($P<0,05$) lo cual se asoció con un mayor control del proceso infeccioso, demostrado por el menor número de bacterias recuperadas de la GM al final del ensayo. Si bien a las 118, 216 y 264 hs pi, el aflujo de MM, linfocitos T y B a la GM estimuladas por la cepa B se incrementó ($P<0,05$), éste no fue eficiente para el control de la infección a juzgar por el alto número de UFC/ml recuperadas de la GM en estos periodos. La respuesta inmune del hospedador difirió con cada cepa, observándose una mayor y más efectiva respuesta inicial para la cepa A con respecto a la B. Posteriormente, una segunda respuesta celular, estimulada principalmente por la cepa B, posiblemente debida a la reagudización del proceso infeccioso, que no fue efectiva para controlar la IIM.

037 (313) FOTOINACTIVACIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS A PARTIR DE UNA NUEVA PORFIRINA SINTÉTICA

Leandro A Mamone[1]; Darío Ferreyra[2]; Gabriela M Di Venosa[1]; Pablo Vallecorsa[1]; Daniel Sáenz[1]; Gustavo Calvo[1]; Alcira Batlle[1]; Fernanda Buzzola[3]; Edgardo Durantini[2]; Adriana G Casas[1]
CIPYP[1] Univ. Nac. de Rio Cuarto[2] IMPaM[3]

La terapia fotodinámica antimicrobiana (TFDA) ha surgido como un tratamiento alternativo antimicrobiano frente al cual las bacterias no podrían desarrollar resistencia. Esta modalidad emplea una molécula fotosensibilizante (FS), que es capaz de generar especies reactivas en presencia de oxígeno luego de absorber un fotón de luz visible. Las porfirinas y sus derivados modificados sintéticamente, se encuentran entre las especies químicas usualmente empleadas como FS. En este trabajo, estudiamos la acción de una nueva porfirina: 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-N,N-dimetilaminopropoxi)fenil]porfirina (TAPP) como FS en S. aureus creciendo tanto en suspensión como biopelícula. El espaciador alifático del TAPP provee gran movilidad al grupo amino, facilitando la unión a la célula bacteriana. Evaluamos la toxicidad de TAPP en oscuridad y luego de irradiar con luz blanca (fototoxicidad o TAPP-TFDA) cultivos de Staphylococcus aureus de la cepa RN6390 en crecimiento planctónico o en biopelículas crecidas sobre poliestireno. En los cultivos planctónicos, no registramos efectos tóxicos en oscuridad empleando concentraciones de TAPP menores a 5 μM. Usando una concentración de 2,5 μM de TAPP y una dosis lumínica de 165 J cm-2, obtuvimos la erradicación total bacteriana (8 logs de reducción en la supervivencia de la fracción tratada vs el control sin tratar). Las biopelículas de S. aureus fueron menos sensibles a la fotoinactivación que los cultivos en suspensión. La toxicidad de TAPP en oscuridad se observó a concentraciones superiores a 30 μM. Luego de la irradiación (165 J cm-2), registramos fotoinactivación de la biopelícula empleando TAPP 20 μM, obteniendo una reducción de 2 logs en las UFC/ml. También analizamos los efectos de la TAPP-TFDA sobre biopelículas, por microscopía de fluorescencia luego de tinción con elkitLIVE/DEAD y por microscopía electrónica. Nuestros resultados indican que la TAPP-TFDA es promisoria para el tratamiento de infecciones de bacterias Gram positivas.

038 (364) EFECTOS DEL CO-TRATAMIENTO CON LA TOXINA SHIGA TIPO 2 Y LA CITOTOXINA SUBTILASA EN RATONES BALB/C. CONTRIBUCIÓN A LA PATOGÉNESIS DEL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO

Alvarez, Romina Soledad; Girard, Magalí Celeste; Sacerdoti, Flavia; Ibarra, Cristina; Amaral, María Marta
Laboratorio de Fisiopatogenia, IFIBIO-CONICET, Facultad de Medicina, UBA.

Las infecciones por Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) pueden causar diarrea acuosa, colitis hemorrágica y complicaciones sistémicas conocidas como Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). En Argentina, el SUH es la primera causa pediátrica de insuficiencia renal aguda (IRA) como resultado de la destrucción de las células endoteliales y epiteliales renales por acción de la toxina Shiga tipo 2 (Stx2). Previamente, demostramos que la citotoxina Subtilasa (SubAB), identificada en cepas de STEC, disminuye la viabilidad celular por apoptosis en células endoteliales glomerulares humanas y en la línea epitelial renal HK-2. El objetivo de este trabajo se centró en estudiar los efectos in vivo del co-tratamiento con Stx2 y SubAB. Para ello, ratones BALB/c al momento del destete (18-21 días de edad) fueron inoculados por vía intraperitoneal con 1 ng Stx2; 0,2 µg SubAB o [1 ng Stx2 + 0,2 µg SubAB] /g de peso corporal. El grupo control fue inoculado con PBS. A continuación, se evaluó la sobrevida, el peso corporal y la ingesta de agua y comida. Los ratones tratados con ambas toxinas murieron en promedio a las 48 hs mientras que los tratados con Stx2 o SubAB murieron a las 72 hs (log-rank test; *p<0,001, n=7). El co-tratamiento causó una disminución significativa del peso corporal respecto a las toxina por separado (media ± MES ([peso final – peso inicial] (g); [Stx2 + SubAB] = -0,8 ± 0,1 vs Stx2 = -0,5 ± 0,1 y SubAB = -0,5 ± 0,1; control: 0,2 ± 0,1; n=7 *p < 0,05). Este descenso del peso corporal se relaciona con una menor ingesta de comida (g) ([Stx2 + SubAB] = 0,5 ± 0,2 vs Stx2 = 1,2 ± 0,3 y SubAB = 0,9 ± 0,1; control: 2,2 ± 0,2; n=3 *p < 0,05). En relación a la ingesta de agua, no se observó diferencias significativas. Estos resultados indican que la acción conjunta de ambas toxinas induce daños más severos que podrían contribuir a la patogenia del SUH desencadenada por STEC productor de Stx2 y SubAB.

039 (365) EXPRESIÓN DE VARIANTES DEL ANTÍGENO DE SUPERFICIE DEL VIRUS HEPATITIS B (HBSAG) PARA MEJORAR LA EFICACIA DE LA VACUNA ACTUALMENTE COMERCIALIZADA

Priscila Perazzo[1]; Naír Magalí Eguibar[1]; Andrea Sordelli[1]; Nicolas Rodríguez Del Valle[1]; Rodrigo González[2]; Alejandro Nusblat[2]; María Lujan Cuestas[1]
IMPAM[1] NANOBIOTEC - UBA-CONICET[2]

La circulación de mutantes del antígeno de superficie del virus hepatitis B (HBsAg) en presencia de anticuerpos anti-HBs tanto en pacientes que recibieron una adecuada inmunización activa/pasiva, como así también en individuos con hepatitis B crónica durante el curso natural de la infección constituye un importante problema de Salud Pública. D144A y G145R son las mutantes de escape más ampliamente reportadas en el mundo y no están incluidas en las vacunas anti-HBV actualmente comercializadas. Objetivos: optimizar la expresión en células eucariotas del gen s salvaje y mutado en las posiciones D144A y G145R y caracterizar su interacción con anticuerpos neutralizantes para HBsAg salvaje. Materiales y métodos: los genes correspondientes al HBsAg salvaje y mutado fueron sintetizados y clonados en el vector de expresión pPICZa y pTriEx®-63C/LIC y transformados en la cepa *Pichia pastoris* X-33 o transfectados en distintas células de mamífero, respectivamente (CHO, HeLa, Huh 7, HEK293). Para la transfección, se ensayaron diferentes condiciones (distintos agentes de tansfección, medios de cultivos, tiempos de transfección, presencia o no de DMSO 1,25%). Para la detección del HBsAg, se tomaron muestras a distintos tiempos y se realizaron ensayos de ELISA comercial y Western blot. Se caracterizaron las VLPs y se midió la reactividad del HBsAg mutado y salvaje in vitro (TEM y DLS) e in silico. Resultados: se logró una moderada expresión en las células HEK293 transfectadas con L-PEI con una relación N/P = 10, a las 144 h post-transfección. Con *P. pastoris*, se obtuvieron mayores niveles de expresión, y las VLPs obtenidas presentaron un tamaño aproximado de 20 nm y la reactividad con los anticuerpos anti-HBs fue variada. Conclusiones: la optimización de la expresión del HBsAg salvaje y mutado en células de mamífero y en *P. pastoris* constituye una primera aproximación para un potencial subsiguiente uso para la obtención de futuras vacunas anti-HBV con superior espectro antigénico.

040 (371) 5-EPI-ICETEXONA OBTENIDO DE SALVIA GILLIESII ES ACTIVO CONTRA TRYPANOSOMA CRUZI EN LA ETAPA AGUDA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS REPRODUCIDA EN ANIMALES

Esteban Lozano[1]; Maríana Strauss[2]; Renata Spina[1]; Diego Cifuente[3]; Carlos Tonn[3]; Walter Rivarola[2]; Miguel Sosa[1]
IHEM-CONICET FCM UNCuyo[1] INICSA- CONICET Cát. Fís. Bioméd FCM, UNC[2] INTEQUI-CONICET FQByF UNSL[3]

Trypanosoma cruzi, agente causal de la enfermedad de Chagas, afecta a millones de personas en Latinoamérica. La quimioterapia contra T. cruzi sigue siendo insuficiente debido a que las drogas disponibles, Nifurtimox y Benznidazol, tienen actividad limitada y efectos secundarios tóxicos en pacientes. En la búsqueda de nuevas terapias, los terpeniodes son atractivos por su abundancia en el reino vegetal y son activos contra varios parásitos. El diterpeno 5-epi-icetexona (ICTX), obtenido de Salvia gilliesii, afecta las diferentes formas de desarrollo T. cruzi. Nos propusimos evaluar el efecto de la administración de ICTX (10 mg/kg/día) en ratones infectados con la cepa Tulahuen (Tc VI) de T. cruzi, simulando la fase aguda de la enfermedad. Metodología: Diferentes grupos de ratones Albino Swiss fueron utilizados: animales sin infectar, infectados sin tratamiento, o infectados y tratados intraperitoneamentel con ICTX. Otro grupo de animales infectados fueron tratados oralmente con BZN (control de efecto antiparasítico). Durante 30 días de tratamiento, se analizó la parasitemia y supervivencia en los ratones. Se realizaron estudios histopatológicos a la 5ta semana de tratamiento en cada grupo. Resultados: Se observó un aumento importante en la supervivencia de ratones infectados y tratados (ICTX o BZN) con respecto a los no tratados. La parasitemia disminuyó significativamente en los ratones tratados (ICTX o BZN) con respecto a los controles. En la histopatología de músculo cardiaco y esquelético observamos la presencia de nidos de amastigotes entre las fibras musculares de los controles, acompañado de desorganización tisular e infiltrado inflamatorio. Nada de esto fue observado en los animales tratados (ICTX o BZN). Conclusiones: Demostramos que ICTX es también efectivo contra los parásitos en animales infectados, sin afectar la salud de los animales. Estos hallazgos transforman a ICTX en una prometedora droga que podría ser utilizada en el tratamiento contra la enfermedad.

041 (373) EFECTO INMUNOMODULATORIO DE UN EXTRACTO VEGETAL DE USO MEDICINAL (SMILAX CAMPESTRIS) EN CÉLULAS MACROFÁGICAS

Luciana Soledad Salaverry[12]; Andrea Cecilia Parrado[12]; Tomas Lombardo[12]; Franco Mangone[12]; Florencia Scotto[12]; Ana Rugna[3]; Guillermo Blanco[2]; Teresa Gentile[12]; Andrea Canellada[12]; Estela Rey-Roldan[12]
Cátedra de Inmunología- Facultad de Farmacia y BioQuímica. UBA[1] IDEHU Dr R.A. Margni[2] Cátedra de Farmacobotanica- Facultad de Farmacia y BioQuímica. UBA[3]

La medicina popular se ha caracterizado por emplear diversos extractos vegetales con fines medicinales, por sus efectos anti-inflamatorios y anti-oxidantes. Entre las plantas medicinales empleadas se encuentra la “zarzaparrilla”, siendo *Smilax campestris*(*S. campestris*) una especie con amplia distribución en el norte de nuestro país. En este trabajo evaluamos el efecto inmunomodulatorio de un extracto acuoso de rizomas de *S. campestris* sobre la actividad de enzimas metaloproteínasas (MMP, zimografía), la producción de anión superóxido y de glutatión (citometría

de flujo), en una línea celular monocítica-macrofágica humana THP-1 sometida a dos condiciones: ausencia (estado basal) o presencia (estado activado) del lipolisacárido (LPS). Las células se incubaron con distintas dosis del extracto de S. campestris (1, 10, 100, 1000 y/o 10.000 ng ac. tánico/ml extracto) durante 24hs; en el caso de la condición activada por el lipopolisacárido adicionalmente se incubaron las células macrofágicas con LPS (1 µg/ml) durante 24hs (anión superóxido y glutatión) o 48hs (MMP). En condiciones basales, bajas concentraciones del extracto (10 ng/ml) incrementan la actividad MMP-9 ($p<0,01$), efecto que correlaciona con un aumento en los niveles de anión superóxido ($p<0,05$), sin modificar los niveles de la molécula antioxidante glutatión. Contrariamente, en células macrofágicas en estado activado, altas dosis de extracto (100 y 1000 ng/ml) disminuyen la actividad de MMP-9 inducida por LPS ($p<0,01$), consistente con el efecto antiinflamatorio descripto en la bibliografía, sin observarse cambios en los niveles de glutatión. De esta forma, sugerimos un efecto inmunomodulatorio del extracto acuoso de S. campestris sobre la actividad de células macrofágicas.

042 (423) DESARROLLO DE MÉTODOS PARA DETERMINAR PERFILES PROTEÓMICOS Y ACTIVIDADES DE QUINASAS AFECTADOS EN EL CITOPLASMA DE MACRÓFAGOS HU- MANOS INFECTADOS CON MYCOBACTERIUM AVIUM PARA IDENTIFICAR NUEVOS BIOMARCADORES PROTEICOS Y CARACTERIZAR BLANCOS TERAPEÚTICOS

Cristian Jorge Alejandro Asensio[12]; Rodolfo C. García[2]
BIOMED[1] ICGEB, TRIESTE, ITALIA[2]

La tuberculosis, infección crónica con mycobacterias, no puede controlarse satisfactoriamente a nivel mundial por diversos motivos incluyendo la proliferación de cepas multi-resistentes a antibióticos. Identificar nuevos biomarcadores proteicos y nuevos blancos terapéuticos en las células infectadas ayudaría a modular la respuesta inmune a favor de ellas, independientemente de los antibióticos. Con este fin desarrollamos nuevos métodos proteómicos comparativos y de alta sensibilidad y otros bioquímicos, para buscar sistemáticamente alteraciones inducidas por la infección mycobacteriana en los perfiles de quinasas y de proteínas en macrófagos. Nos enfocamos en el citoplasma, compartimiento donde residen crónicamente las mycobacterias alterando un gran número de vías de señalización. La búsqueda fue orientada a identificar algunos blancos proteicos de la acción disruptiva del Mycobacterium avium como modelo. La estrategia general consistió en el análisis sistemático de células de la línea humana THP-1, infectadas durante distintas longitudes de tiempo, hasta días. Utilizamos ensayos radioactivos in vitro para marcar diferencialmente proteínas en las fracciones citoplásmicas. Los optimizamos para usar preferencialmente la actividad de quinasas de interés. El objetivo fue buscar diferencias reproducibles en los perfiles de proteínas marcadas in vitro utilizando geles 1D o 2D y comparando con células no tratadas o ingiriendo partículas de latex. Usando inhibidores peptídicos y químicos identificamos las quinasas involucradas en el marcado in vitro de las proteínas expresadas diferencialmente. Con otro método basado en arrays dispuestos en papel P81 con 600 posiciones, las actividades de quinasas relevantes fueron comparadas. Estos procedimientos permitieron la comparación simultánea de varias quinasas en citosoles y membranas y el hallazgo de nuevos biomarcadores proteicos afectados reproduciblemente en sus niveles de expresión debido a la infección. Fondos ICGEB.

043 (457) SE RETIRÓ EL RESUMEN

044 (466) DIVERSIDAD GENÉTICA DE CEPAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS AISLADAS DE INFECCIONES INTRAMAMaríaS PERSISTENTES Y NO PERSISTENTES Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRESENCIA DE GENES DE VIRULENCIA Y LA PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULA

Sofia Clara Sacco[1]; Elizabet Amanda Pereyra[1]; María Sol Renna[1]; Carolina Soledad Andreotti[1]; Cecilia María Camussone[2]; Luis Fernando Calvinho[2]; Bibiana Elisabet Dallard[1]
Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, ICIVET-Litoral, UNL-CONICET[1] EEA Rafaela, INTA[2]

El objetivo de este trabajo fue evaluar la diversidad genética de cepas de S. aureus aisladas a partir de infecciones intramaMarías (IIM) bovinas persistentes (P) y no persistentes (NP) y establecer asociaciones con la presencia de genes cap, ica, agr, bap, blaZ y la producción de biopelícula. Se seleccionaron 33 cepas de S. aureus aisladas a partir de leche de bovinos con IIM clínicas y subclínicas. Las cepas aisladas solo una vez durante la lactancia fueron consideradas NP (n=25) y aquellas aisladas a partir de 3 muestreos consecutivos cada 21 días fueron consideradas P (n=8). La diversidad genética se evaluó por macrorrestricción con SmaI y posterior electroforesis en campos pulsados (PFGE), la presencia de genes de virulencia por PCR y la cuantificación de la producción de biopelícula en microplaca. La evaluación por PFGE discriminó 25 pulsotipos (PT) que fueron designados con letras (A-Y). El PT-Q estuvo representado por 6 cepas NP (19%), el PT-C representado por 2 cepas NP (6%) y el resto de los PT representados por una única cepa. Del total de cepas, 44% (14/32) fueron positivas a cap5, 48% (16/33) positivas a cap8 y 6% (2/33) negativas para ambos genes. El 97% (32/33) fueron positivas para icaA e icaC y el 100% (33/33) positivas para icaD. El 97% (30/31) se identificaron como agrI y el 3% (1/31) como agrII; no se detectaron cepas agrIII y agrIV. El 100% resultó bap negativa. El 21% (7/33) fue blaZ positiva. El 100% de las cepas mostró capacidad para producir biopelícula: débil 33% (11/33), moderada 33% (11/33) y fuerte 33% (11/33). El 50% (4/8) de las cepas P fueron fuertes productoras de biopelícula, mientras que solo el 28% (7/25) de las NP mostraron esta capacidad. No se demostró asociación entre genotipos, presencia de genes de virulencia y producción de biopelícula con el origen de la cepa (P o NP). El alto porcentaje de cepas NP con fuerte capacidad para producir biopelícula podría asociarse con la persistencia en la glándula maMaría bovina.

045 (482) DETECCIÓN POR PROTEÓMICA DE LA PRIMERA VARIANTE POST-TRADUCCIONAL Y CITOSÓLICA DE LA HSP-A5 NO AFECTADA POR EL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO PERO GENERADA ESPECÍFICAMENTE DURANTE LA ACTIVACIÓN DE RESPUESTAS INMUNES INNATAS

Cristian Jorge Alejandro Asensio[12]; Rodolfo C. García[2]
BIOMED[1] ICGEB, Trieste, Italia[2]

Identificamos varias proteínas citoplásmicas influenciadas en su expresión durante la infección bacteriana de macrófagos humanos. Nos enfocamos en una que siempre aumentó luego de la infección bacteriana o mycobacteriana. Se determinó pI e identidad y también su cinética de aumento durante 4 días post-infección, modelando infecciones intracelulares establecidas. Curiosamente, la proteína es una variante de la HSP-A5, chaperona del retículo endoplásmico (RE). Muestra un pI lejano del esperado y una localización citosólica no común para esta chaperona conocida por estar presente principalmente en el lumen del RE. Determinamos la vía de señalización de los macrófagos por la cual la infección bacteriana dispara, a nivel post-traduccional, el aumento reproducible de esta variante mediante un receptor inmune. Interesantemente, es una vía totalmente independiente del estrés del RE y no controlable por las bacterias ensayadas. Observamos que infecciones que no estresan el RE igualmente generan aumento de la nueva variante de HSP-A5. También, varios compuestos que estresan el RE no pueden modular la variante a pesar de aumentar, como esperado, la HSP-A5 normal. Optimizamos el único método para detectar con alta sensibilidad esta variante post-traduccional de muy baja abundancia (no analizable por western blot). El método, 30 veces más sensible que la coloración argéntica en geles, no necesita de separación bidimensional de proteínas. Proponemos a la variante como nuevo biomarcador proteico específico útil para comparar los efectos de la infección por distintas bacterias o por sus componentes de pared. El biomarcador es parte de una respuesta automática y sostenida en el tiempo de los macrófagos a infecciones. Este hallazgo prueba que programas sistemáticos de comparación de proteomas, sin hipótesis y utilizando estrategias alternativas, develan nuevas

proteínas y mecanismos por los cuales los macrófagos modulan sus respuestas a las infecciones en el citoplasma.

046 (485) CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO (BNCT) COMO TERAPIA PARA ARTRITIS: ESTUDIO A BAJA DOSIS EN EL REACTOR NUCLEAR RA-1 EN MODELO DE ARTRITIS INDUCIDA POR ANTÍGENO EN CONEJOS

Verónica Andrea Trivillin[12]; Leandro Bruno3; David A Gatti[3]; Mariela Stur[4]; Marcela A Garabalino[1]; Andrea Monti Hughes[1]; Jorge Castillo[1]; Hugo Scolari[1]; Amanda E Schwint[12]; Sara Feldman[235]
CNEA[1] CONICET[2] LABOATEM-UNR[3] Diagnóstico por Imágenes FCM[4] CIUNR[5]

BNCT es una terapia binaria que se basa en la incorporación preferencial de compuestos borados al tejido blanco y la posterior irradiación con neutrones. Se demostró su eficacia terapéutica para diversos tipos de tumor. Se exploran nuevas aplicaciones de BNCT como el tratamiento de artritis reumatoidea (AR), buscando dañar selectivamente la membrana sinovial patológica. En estudios previos de biodistribución de los compuestos borados BPA y GB-10 administrados por via intra-articular (ia) en un modelo de artritis inducida por antígeno en conejos hembras New Zealand (AIA) demostramos la incorporación de [B] terapéuticas a la membrana sinovial patológica. Nuestro objetivo fue realizar estudios de BNCT en el Reactor Nuclear RA-1 a baja dosis (2.4 a 3.9 Gy a sinovial) empleando BPA (0.26 mg 10B) y GB-10 (5 mg 10B) administrados ia en 3 conejos AIA (6 articulaciones) por grupo. Dos meses post-tratamiento se evaluaron clínica, bioquímica e imagenológicamente. Animales tratados (AIA-BNCT) no presentaron tumefacción, ni dolor frente a la palpación en las articulaciones. Los niveles de TNF-alfa e IFN-γ no disminuyeron significativamente respecto a AIA sin tratar, probablemente debido a que BNCT es un tratamiento local. Estudios de RMN de articulaciones femorotibiorotuliana de AIA-BNCT, reveló en el 100% de los casos imágenes similares a las de grupo control sin AIA (C), sin necrosis y sin derrame peri-articular. El estudio histológico de membranas sinoviales obtenidas post-mortem (3 observadores independientes, 50 campos/muestra) mostró en 70 a 100% de los campos de AIA-BNCT características histológicas similares a las de C (sin hiperplasia de sinoviotelio, escaso o nulo infiltrado linfoplasmocitario, angiogénesis conservada). En 3/6 conejos se observaron algunas zonas con fibrosis. GB-10-BNCT y BPA-BNCT, aún a bajas dosis, podrían considerarse terapéuticamente útiles para el tratamiento local de artritis.

047 (497) INMUNIZACIÓN DE VACAS PREÑADAS CON STX2INDUCEN ALTOS TÍTULOS DE ANTICUERPOS EN EL CALOSTRO QUE NEUTRALIZAN LA INFECCIÓN DE RATONES AL DESTETE CON E. COLI O157:H7 PRODUCTOR DE STX2

Adriana Andrea Albanese[1]; Romina Fernandez Brando[2]; Bettina C Rabinovitz3; Marina Palermo[2]; Angel Cataldi[3]; C Ibarra[1]
Laboratorio de Fisiopatogenia, IFIBIO-CONICET, Facultad de Medicina, UBA[1] IMEX-CONICET, Academia Nacional de Medicina[2] Instituto de Biotecnología, INTA-Castelar[3]

E. coli O157:H7 es responsable de una variedad de síntomas clínicos que incluyen diarrea acuosa, colitis hemorrágica y Síndrome Urémico Hemolítico, una complicación sistémica grave asociada con frecuencia a la toxina Shiga tipo 2 (Stx2). El objetivo de este estudio fue purificar las inmunoglobulinas hiperinmunes (IgG) anti-Stx2 presentes en el calostro de vacas inmunizadas y evaluar la capacidad neutralizante de las IgG sobre la citotoxicidad de Stx2. Vacas preñadas se inmunizaron por vía intramuscular con Stx2 inactivada (100 µg, Phoenix, USA) 40 días y 20 días previo al parto. El calostro se recogió dentro de las 24 hs y las IgG hiperinmunes se purificaron por cromatografía de afinidad. La capacidad de neutralización se determinó por: 1) Citotoxicidad en células Vero y HCT-8; 2) Alteraciones en colon ligado de rata 3) Letalidad en el modelo del ratón lactante. La preincubación (30 min, 37ºC) de Stx2 o E. coli O157:H7 (cepa 125/99 Stx2+) con las IgG hiperinmunes neutralizó la acción citotóxica de la toxina en las líneas celulares y en el colon ligado de rata. A su vez, ratones destetados que recibieron 15 mg de IgG hiperinmune por vía intragástrica (IG) 1 h antes y 2 hs después del desafío con una dosis letal de E. coli O157:H7 mostraron una sobrevida del 100%. Estos resultados sugieren que las vacas preñadas inmunizadas con Stx2 producen IgG hiperinmunes en el calostro capaces de neutralizar la patogenicidad de E. coli O157: H7.

048 (527) USO DE MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DISTINTAS A LA FOSFORILACIÓN CÓMO NUEVO MÉTODO PROTEÓMICO PARA MARCAR IN VITRO CON FÓSFORO PROTEÍNAS CITOPLÁSMICAS LUEGO DE LA COSECHA DE MACRÓFAGOS HUMANOS INFECTADOS O NO

Cristian Jorge Alejandro Asensio[12]; Rodolfo C. García[2]
BIOMED[1] ICGEB, TRIESTE, ITALIA[2]

Encontrar proteínas afectadas en su expresión específicamente como consecuencia de estímulos de células en cultivo es un objetivo de la Proteómica. Nuevos métodos de marcación y comparación de proteomas serán útiles, si revelan cuantitativa y reproduciblemente en geles los perfiles proteicos no detectables por las coloraciones tradicionales de proteínas (coomassie y argéntica). Aumentarán la posibilidad de detectar biomarcadores proteicos específicos de patologías, en especial los de baja abundancia relativa. Para esto, usando ensayos in vitro optimizamos la marcación de proteínas citoplásmicas de macrófagos luego de la cosecha y fraccionamiento sub-celular. Utilizamos reacciones distintas a la fosforilación de proteínas pero también basadas en la marcación con fósforo 32. Nos enfocamos en el uso de nucleótidos marcados radioactivamente como dadores in vitro de fosfato. Este tipo de reacciones tiene las ventajas de que no dependen de las quinasas de proteínas presentes en las fracciones. Además, siendo modificaciones post-traduccionales poco usadas en células humanas o animales se aumenta la probabilidad de que haya muchos sitios disponibles en varias proteínas para ser marcados in vitro. Hemos logrado obtener perfiles de proteínas distintos al de fosforilación y que inclusive varían entre tratamientos o a consecuencia de la infección. Interesantemente, algunas proteínas no son fácilmente detectadas por fosforilación *in vitro* pero si por las otras modificaciones ensayadas aquí, demostrando que tienen sitios vacantes para ser marcados. El nivel de marcación es proporcional al nivel de expresión de las proteínas marcadas por lo que estos tipos de marcación con fósforo son nuevos métodos de "coloración" con alta sensibilidad y reproducibilidad. Los proponemos como herramienta alternativa de comparación de proteomas, independiente del fosfoproteoma y mostramos su aplicación en el análisis de una línea celular humana para hallar diferencias de expresión proteica.

049 (538) EVALUACIÓN DEL EFECTO INMUNOPROTECTOR DE UN EXTRACTO DE PANAX GINSENG EN UN MODELO MURINO DE MASTITIS POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Paula Silvestrini[1]; Sofía Sacco[1]; Camila Beccaria[1]; María S. Renna[1]; Hugo H. Ortega[1]; Luis F Calvinho[2]; Bibiana E Dallard[1]; Celina Baravalle[1]
ICIVET[1] EEA Rafaela, INTA.[2]

El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto inmunoprotector de un extracto de Panax ginseng (PG) aplicado en forma previa al desafío experimental en ratones con una cepa de Staphylococcus aureus aislada de mastitis bovina. Se utilizaron dos grupos de ratones cepa BALB/cJ en lactancia que fueron inoculados en forma intramaMaría (IM) con 100 µl de extracto de PG (50mg/ml) y con 100 µl de solución fisiológica (SF). A las 72 hs post inoculación, ambos grupos fueron desafiados con una dosis de 1x105 UFC/glándula maMaría (GM) de S. aureus (cepa Newbould). A los 6, 24, 48, 72 y 96 hs post infección (pi) se extrajeron las GM y se evaluó la expresión génica de los receptores de la inmunidad innata tipo toll TLR2 y 4 y de las citoquinas IL1α y TNFα. Asimismo se cuantificó el número de UFC/GM recuperadas pi. La expresión génica de TLR2 y 4 fue mayor en las GM tratadas con PG en

comparación con las tratadas con SF a las 48 hs pi ($p<0,05$), no así en los demás periodos donde la expresión de ambos receptores fue similar. La expresión génica de IL1α y TNFα estuvo influenciada por la infección ($p<0,05$) y por el tiempo de muestreo ($p<0,05$), observándose los mayores niveles de expresión a las 48 hs para IL1α ($p<0,05$) y a las 24, 48 y 72 hs pi para TNFα ($p<0,05$) en las GM tratadas con PG en comparación con las tratadas con SF. La recuperación de S. aureus de las GM inoculadas con PG fue menor a la observada para las GM inoculadas con SF a lo largo de todo el muestreo ($p<0,05$). El aumento en la expresión génica de los receptores de la inmunidad innata y de las citoquinas proinflamatorias, así como también la mayor capacidad para controlar la infección bacteriana por parte de los animales previamente tratados con PG, indicarían un efecto protector luego de la infección IM experimental en ratones. Estudios futuros utilizando bovinos en producción, permitirán generar conocimientos para el desarrollo de nuevos compuestos inmunoprotectores para el control de las infecciones IM

050 (569) SENESCENCIA PREMATURA Y EXPRESIÓN DIFEREN- CIAL DE FACTORES INFLAMATORIOS EN CÉLULAS DEL EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA: IMPLICANCIAS EN LA DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA CON LA EDAD

Mariela C. Marazita[1]; Andrea Dugour[2]; Marquioni Ramella Melisa[1]; Juan M. Figueroa[2]; Angela M. Suburo[1]
Universidad Austral Fac. de Cs. Biomédicas[1] Fundación Cassará[2]

El mecanismo de senescencia celular prematura gatilla la expresión de numerosos factores inflamatorios (senescence associated secretory phenotype, SASP) que podrían contribuir en la degeneración tisular característica de las enfermedades del envejecimiento. La degeneración macular asociada con la edad (DMAE) es una de las principales causas de discapacidad visual irreversible en mayores de 65 años. Sumado a la edad, el hábito de fumar es uno de sus principales factores de riesgo. El componente inflamatorio y altos niveles de estrés oxidativo juegan un rol importante en su progresión. Objetivos: Evaluar en cultivos senescentes de células del epitelio pigmentario de la retina ARPE-19, la expresión diferencial de factores involucrados en el desarrollo de la DMAE. Metodología: Células ARPE-19 fueron incubadas con un concentrado de humo (CHC 200 µg/ml Murty Pharma por 72 horas y 9 días de cultivo en medio fresco) o H_2O_2 (150 µM por 90 minutos y 10 días de cultivo en medio fresco). La inducción de senescencia por CHC o H_2O_2 fue estudiada mediante la detección de la actividad de ß-galactosidasa (ß-gal +) y la expresión de p21 y p16 por Western blot. Los niveles de IL-6 e IL-8 fueron analizados por qPCR y ELISA. Los niveles de VEGF y factor de complemento H (CFH) fueron estudiados por qPCR y Western blot. Resultados: Los cultivos senescentes aumentaron significativamente la expresión y secreción de IL-6 e IL-8 ($p < 0,001$), así como también, la expresión de VEGF ($p < 0,01$). Por el contrario, disminuyeron la expresión del factor de complemento H ($p < 0,01$). Conclusiones: La inducción de senescencia celular en el EPR desregula la expresión de factores inflamatorios ligados a la progresión de la DMAE. El SASP podría contribuir al estado de inflamación crónica característico de la enfermedad. El aumento en la expresión de VEGF podría estar asociado a procesos de neovascularización, mientras que la disminución de CFH podría promover la activación de la vía del complemento.

051 (585) CAMBIOS MORFOLÓGICOS DE LA HISTOARQUITECTURA PULMONAR EN RATONES INFECTADOS CON HELICOBACTER PYLORI

Andrea Celeste Arismendi Sosa[1]; Angel Gabriel Salinas Ibañez[1]; Veronica Perez Chaca[1]; Silvana Piguillem[1]; Florencia Fatima Ferramola[1]; Alba Edith Vega[1]; Alicia Penissi[2]; Cristina Aguilera[2]; Nidia Noemi Gómez[1]
Univ. Nac. de San Luis Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia[1] IHEM, Fac. de Cs. Médicas Univ. Nac. de Cuyo[2]

Los pulmones comparten el mismo origen embriológico con la túnica mucosa del estómago, estudios recientes sugieren una asociación entre la infección por H. pylori y patologías extragastroduodenales entre las que se incluyen las enfermedades respiratorias. La respuesta inmune celular frente a H. pylori desencadena un proceso inflamatorio asociado a la activación de macrófagos e inducción de daño tisular. El objetivo de este trabajo fue estudiar en modelo experimental de ratón de la cepa BALBc; si la infección orotraqueal con H. pylori induce una respuesta inflamatoria y su impacto en la histoarquitectura pulmonar. Se realizó una infección de ratones machos WT con una suspensión de H. pylori por vía orotraqueal cada 72 h, luego fueron sacrificados a los 3, 7,17, 22 y 31 días. Se les extrajo el pulmón de forma aséptica, los que fueron preparados para técnicas histológicas y teñidos con Hematoxilina-Eosina, Tricromico de Masson y Ácido periódico Schiff (PAS). El recuento bacteriano del pulmón fue determinado por la homogeneización de este órgano en solución salina y luego los homogenatos se sembraron en agar Mueller-Hinton y se contaron las unidades formadoras de colonias (CFU) después de la incubación por 72 h a 37°C. La histoarquitectura pulmonar (H&E) revela espacios alveolares expandidos que se intensifican con mayor tiempo de tratamiento. Se observa migración de células, principalmente en aéreas cercanas a los bronquiolos, en animales infectados. La tinción de TCM demuestra un incremento en el tejido conectivo alrededor de bronquiolos en los grupos infectados. Se observa regiones PAS (+) en macrófagos alveolares, como también a nivel extracelular. En todos los casos el cuadro se va modificando e incrementando el grado de compromiso pulmonar al aumentar el tiempo de tratamiento. Por lo que los resultados obtenidos nos permiten plantear el posible papel patogénico de H. pylori en las vías respiratorias, especialmente en personas con reflujo gastroduodenal.

052 (588) MECANISMO ANTI-INFLAMATORIOS DE LA NITRONA5,5-DIMETIL-1-PIRROLINA N-ÓXIDO

Muñoz, Marcos; Della Vedova, María Cecilia; Rinaldo Tosi, Martin; Germano, María Jose; Gómez Mejiba, Sandra; Alvarez, Sergio; Zili, Zhai; Ramirez, Daro
IMIBIO-SL

La activación inflamatoria de los macrófagos tisulares induce su fenotipo inflamatorio (o tipo M1). Estas células M1 son centrales en la patología de muchas enfermedades inflamatorias crónicas (EIC), incluyendo inflamación del tejido adiposo (TA) en obesidad. La búsqueda de nuevas estructuras líderes basadas en mecanismos es uno de los objetivos fundamentales de la industria farmacéutica para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de las EIC. La nitrona 5,5-dimetil-1-pirrolina N-óxido (DMPO) es un compuesto que reacciona con radicales libres y por lo tanto los estabiliza para su estudio e in vivo previene las reacciones en cadena que conducen a la formación de productos oxidados. El modelo de células RAW265.7 activadas con 1 ng/ml LPS es un buen modelo de inducción de un fenotipo M1 en macrófagos y para probar nuevas estructuras con potencial anti-inflamatorio. Este proceso es inhibido por tratamiento simultáneo con 50 mM DMPO y ocurre muy temprano en la cascada de señalamiento inducida por LPS. En efecto, DMPO redujo la inducción de genes inflamatorios (iNOS, TNF-a, IL-6, ICAM-1, etc), activición del NF-kB (translocación de p-P65 al núcleo), cascada señalamiento (ERK1/2, JNK-1/2, P38, degradación de IkB), sin embargo, no afectó la unión de LPS marcado con AlexaFluor488 a TLR-4 (confocal). Estos datos indican que DMPO inhibe la repuesta inflamatoria al LPS en macrófagos debido a su capacidad para reaccionar con anión radical superóxido, un efecto sobre vías posterior a la unión de LPS al TLR-4 (eje., unión de moléculas de señalamiento al dominio TIR de TLR-4) u otro anterior a la activación de PKC-d. La dilucidación de este mecanismo permitiría la formulación de estructuras novedosas con potencial antiinflamatorio, pero que preserven las características del DMPO.

053 (653) PRODUCCIÓN DE INTERLEUKINA 6 POR CULTIVOS DE FIBROBLASTOS DE DURAMADRE HUMANA LUEGO DE LA INFECCIÓN POR VIRUS HERPES SIMPLEX

Julian Herrera[123]; Ezequiel Goldschmidt[23]; Jordi Torres[123]; Viviana Nino[123]; Glenda Nerst[23]; Jorge Geffner[23]; Norberto Sanjuan[123]
IMPAM; Univ. de Buenos Aires; Fac. de Medicina[1] Univ. de Buenos Aires[2] Fac. de Medicina[3]

Los virus Herpes simplex 1 y 2 (HSV 1-2) pueden provocar cuadros de meningoencefalitis con consecuencias diversas. La patogenia de estas enfermedades es sólo parcialmente conocida. Recientemente, uno de nosotros (EG) pudo cultivar, por primera vez –de acuerdo a la bibliografía internacional- fibroblastos de duramadre humana, lo que ha permitido desarrollar diversos modelos in vitro de infecciones bacterianas y virales. Es sabido que las meningoencefalitis por HSV pueden dejar secuelas severas, pero su patogenia no es comprendida cabalmente. El objetivo de este trabajo fue estudiar la infectabilidad y el patrón de liberación de citoquinas por parte de fibroblastos de duramadre humana luego de la infección por HSV 1 ó 2. Se infectaron monocapas de cultivos celulares con una M.O.I = 1 ufp / célula de uno u otro virus y, desde el momento de la inoculación y hasta las 72 hs post-infección (pi) se evaluaron el efecto citopático, la presencia de virus por microscopía electrónica de transmisión (ME), los antígenos virales por inmunoperoxidasa y la liberación de TNF, IL-1 e IL-6 por ELISA. A las 48 hs pi se observó la presencia de antígenos de HSV 1 ó 2 en los cultivos infectados, pero no en los controles, así como partículas virales completas por ME. Mientras que los valores de TNF e IL-1 no mostraron diferencias en los sobrenadantes de cultivos infectados o no infectados, la IL-6 sí lo hizo. La liberación, por parte de los fibroblastos de la duramadre humana, de esta interleucina pro-inflamatoria probablemente contribuya al desarrollo de lesiones cicatrizales secuelares, y aporte información adicional para el tratamiento de estas meningoencefalitis con fármacos anti-inflamatorios.

054 (654) EFECTOS DEL ZINC SOBRE BIOPELÍCULAS PRODUCIDAS POR 5 BACTERIAS PATÓGENAS PARA EL HOMBRE

Nadia Wieczorko[123]; Eduardo Lufi[123]; Gabriela Pereyra Pereyra[123]; Gabriela Reinoso[123]; Ana Romeo[23]; Norberto Sanjuan[123]
IMPAM; Fac. de Medicina; Univ. de Buenos Aires[1] Fac. de Medicina[2] Univ. de Buenos Aires[3]

El zinc es un metal que forma parte de la composición de los filtros de agua comerciales, en los que no hay desarrollo bacteriano. Eso lleva a la hipótesis de que interfiere con el crecimiento bacteriano, probablemente sobre la formación de biopelículas. En este trabajo se estudió el efecto del sulfato de zinc en el desarrollo in vitro de *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis y Escherichia coli*. Se emplearon cepas aisladas de pacientes, que se desarrollaron, por duplicado, en policubetas de plástico conteniendo, cada pocillo, 2 ml de caldo 2xYT. El inóculo fue de 108 UFC en 10 µl de caldo 2xYT. Los pocillos conteniendo cada bacteria recibieron $SO_4Zn.7H_2O$ en concentraciones de 0, 5, 10, 50 y 100 mM y se incubaron a 37°C, observándoselos diariamente, hasta los 3 días post-inoculación (pi). Se realizó recuento de colonias y coloraciones de Gram durante esos 3 días. A las 24 hs todas las bacterias formaron biopelículas en la superficie, en ausencia de SO_4Zn y en las concentraciones 50 y 100 mM, pero no en las de 5 y 10 mM, excepto Proteus mirabilis, que las formó sin o con el agregado de SO_4Zn. El recuento de colonias demostró que *S.aureus* creció sin zinc y no lo hizo en absoluto en las concentraciones 5 y 10 mM. Las demás bacterias, excepto P. mirabilis disminuyeron significativamente el número de colonias en las concentraciones mencionadas. En los cultivos inhibidos por zinc se observaron, además, alteraciones morfológicas. Se concluye que la inhibición del crecimiento bacteriano por zinc a bajas concentraciones y la carencia de la misma a altas concentraciones sugieren un control genético, cuya expresión está en estudio, y que podría tener aplicaciones clínicas.

055 (655) PROTEÍNAS CANDIDATAS COMO BIOMARCADORES EN ENFERMEDAD DE CHAGAS

Santiago Orrillo[1]; Andrea Mesias[1]; Rubén M Cardozo[2]; Natalia Barrientos[3]; Julio Nuñez Burgos3; Nisha J Garg[4]; M. Paola Zago[5]
IPE[1] Dirección Gral de Coordinación Epidemiológica, Ministerio de Salud Pública, Salta;[2] Hospital San Bernardo, Salta[3] Dept. of Microbiology & Immunology, University of Texas Medical Branch (UTMB), Galveston, Tx, USA[4] IPE-CONICET, CCT Salta y Fac de Medicina, Sede Salta, UNT- UNSa[5]

A pesar de los avances en el diagnóstico de la infección por Trypanosoma cruzi, los métodos actuales no permiten identificar los individuos en riesgo de desarrollar síntomas clínicos ni son confiables para evaluar respuesta a tratamientos o el progreso de la enfermedad. Numerosos grupos trabajan en la búsqueda de biomarcadores (BM) que permitan la detección temprana de pacientes seropositivos en riesgo de desarrollar cardiomiopatías y la evaluación de terapias tripanocidas. Este trabajo propone validar el uso de un conjunto de proteínas plasmáticas postuladas como BM por Wen et al. (2012). Se determinó su expresión diferencial mediante Western Blot, con muestras de plasma de pacientes seropositivos para Chagas, voluntarios sanos y pacientes con cardiopatías no chagásicas (OCM) reclutados en el Servicio de Cardiología del Hospital San Bernardo (Salta, Argentina). Se estudiaron las diferencias de expresión no sólo entre grupos experimentales implicados (Chagas+ vs Sanos vs OCM) sino también entre distintas categorías clínicas de pacientes con serología positiva para Chagas (Clasificación de Kuschnir 0 a 3), para darles un valor pronóstico. Los datos muestran que en pacientes con serología positiva hay un incremento estadísticamente significativo en el nivel plasmático de Vinculina (VCL) ($p<0,0005$), Miosina de cadena ligera 2 (MYL2) ($p<0,0001$) y Gelsolina (GSN) ($p<0,0001$) respecto de los sanos u OCM. La expresión diferencial de estas proteínas sería indicativa de la ocurrencia de fibrosis y daño cardíaco durante el desarrollo de la enfermedad, pudiendo constituir marcadores moleculares con valor predictivo y/o pronóstico. Esto brindaría una herramienta útil para mejorar el diagnóstico e iniciar tratamientos paliativos o preventivos en pacientes en los que el BM se anticipe al desarrollo de la patología hasta tanto exista un tratamiento antiparasitario eficaz para la Cardiomiopatía Chagásica Crónica

056 (668) EVALUACIÓN DEL IMPACTO DE FACTORES GENÉTICOS EN LA EVOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN POR HIV DE PACIENTES COINFECTADOS VIH-VHC CON HEMOFILIA

María Cecilia Monzani[1]; Natalia Aloisi[1]; Marcelo Corti[2]; Daniela Neme[2]; M Marta Elizalde De Bracco[1]; Patricia Bare[1]
IMEX[1] Fundacion de la hemofilia[2]

Con la administración de hemoderivados contaminados, un grupo de pacientes hemofílicos fue infectado por VIH y VHC hace más de 30 años. Algunos factores genéticos han sido relacionados con la respuesta inmune que el individuo desarrolla, determinando la evolución de la enfermedad por VIH. Analizamos la presencia de polimorfismos genéticos relacionados con la respuesta inmunológica (IL28b, HLA-B27 y HLA-B57), con la entrada de VIH a las células (correceptor CCR5) y su asociación con parámetros de progresión de la infección por VIH. Se obtuvo ADN genómico a partir de muestras de células mononucleares de sangre periférica de 66 pacientes con hemofilia coinfectados VIH/ VHC. Utilizando técnicas de PCR convencional o touch down se examinaron los genotipos existentes de IL28B (rs12979860) y CCR5. Asimismo, se determinó la presencia de los alelos HLA-B27 y HLA-B57. Se clasificaron los pacientes según sus cargas virales de HIV y valores de linfocitos T CD4+, según su evolución a SIDA, y su respuesta al tratamiento en Controladores de elite (CE), Progresores Crónicos (PCr), Progresores Rápidos (PR). La distribución de los alelos IL28b, CCR5, HLA-B27 y HLA-B57 en los distintos grupos de pacientes definidos según progresión clínica por VIH es: CE: 0.4, 0.4, 0.2, 0.2; Cr1: 0.41, 0.22, 0.15, 0.04; Cr2: 0.68, 0.21, 0.05, 0.11; PR: 0.53, 0.07, 0.13, 0.07, respectivamente. Las frecuencias halladas están dentro de las reportadas en el país. Las frecuencias alélicas de los factores genéticos estudiados, no muestran una contribución estadísticamente significativa en

la progresión clínica de la infección por HIV. Sin embargo, 4 de los pacientes 5 (80%) CE presentaron algún factor genético favorable, mientras que solo estuvieron presentes en 6 de los 15 (40%) PR.

057 (223) RESPUESTA DEL PULMÓN A UNA INFECCIÓN ORAL CON YERSINIA ENTEROCOLITICA O:3

Glenda Daniela Martin Molinero[1]; Jesica V. Gutierrez[2]; Veronica Perez Chaca[2]; Eugenia Ciminari[2]; Gabriel Boldrini[1]; Silvina Alvarez[1]; Nidia N. Gómez
IMIBIO-SL[1] UNSL[2]

Yersinia enterocolitica es una enterobacteria que puede causar infección sistémica con formación de abscesos en diversos órganos, entre ellos el pulmón. Ha sido descripta en casos clínicos de enfermedades respiratorias, lo que indica que el pulmón es uno de sus órganos blanco. Sin embargo, el impacto en pulmón de esta infección de origen gastrointestinal no ha sido profundamente estudiado. Este trabajo contribuye al estudio de los mecanismos que median esta infección y sus posibles secuelas en el estroma pulmonar. El objetivo fue determinar los niveles de estrés oxidativo en diferentes tiempos y la expresión y/o actividad de enzimas antioxidantes, marcadores de inflamación y del estado de la matriz extracelular. Ratones WT fueron infectados por vía intragástrica con 2 x108 UFC de *Y.enterocolitica* O:3. A los 3, 14 y 21 días post infección (pi) los ratones fueron sacrificados. Se evaluó la expresión de SOD2, IL8, VCAM, ICAM, MCP1 y MMP-9, junto con la actividad de CAT a través del tiempo. Los niveles de TBARS aumentaron significativamente a los 14 y 21 días con respecto al control. Al realizar el seguimiento de la actividad de CAT se detectó que a los 14 días aumenta significativamente ($p<0,001$), manteniéndose elevada a los 21 días ($p<0,01$), con respecto al control. A los 21 días (pi) se detectó un aumento significativo de SOD2 ($p<0,05$), IL8 ($p<0,005$), ICAM-1 ($p<0,0001$), MCP1 ($p<0,0001$), VCAM-1 ($p< 0,05$) y MMP-9 ($p<0,005$) con respecto a los grupos control y a los de 3 y 14 días (pi). El aumento de los niveles de TBARS está asociado con el incremento de estrés evidenciado desde el día 14, en conjunto con el reclutamiento de polimorfonucleares y macrófagos, lo que compromete a la matriz extracelular. En síntesis Y. enterocolitica produce un cuadro inflamatorio en el pulmón induciendo una respuesta exacerbada desde el día 14, con un concomitante daño al estroma pulmonar.

068 (622) MÉTODOS Y CRITERIOS PARA VALIDAR Y COMPARAR APTÁMEROS O SECUENCIAS DE ADN EN SU UNIÓN A PROTEÍNAS ADHERIDAS A NITROCELULOSA EN FORMA NATIVA O DESNATURALIZADA

Asensio, Cristian Jorge Alejandro; Masse Ederra, Catalina; Massip Copiz, Mara M.; Clauzure, Maríangeles; Valdivieso, Angel G.; Santa Coloma, Tomas A
BIOMED

Determinar cuali/cuantitativamente la unión del ADN a proteínas adheridas a nitrocelulosa y caracterizarla como específica son objetivos en las etapas de selección de aptámeros de ADN. La especificidad es importante cuando el blanco proteico de los aptámeros se debe detectar en una mezcla compleja de proteínas. En la actualidad, pocos aptámeros de ADN han sido validados en su especificidad en la presencia de mezclas complejas como es necesario con los lisados celulares en south-western. Para facilitar las mencionadas caracterizaciones ensayamos dos tipos de formato: a) el dot-blot para péptidos y proteínas nativas puras y b) el south-western para proteínas recombinantes desnaturalizadas y lisados. Establecer criterios y controles que permitan monitorear la eficacia de los procesos de selección en estos formatos, ahorrando tiempo y esfuerzo, es un importante tema a desarrollar en el área. Para identificar y caracterizar la señal de fondo debida a la unión inespecífica con las proteínas utilizamos una batería de oligonucleótidos y librerías sintéticos de distinta longitud, secuencia y estructura secundaria o topología. Comparamos la unión a varias proteínas y lisados cuando dichos oligonucleótidos están en forma de cadena simple o doble. También utilizamos como controles proteínas o péptidos que pegan ADN inespecíficamente por interacción electrostática u otro tipo de interacciones. Tuvimos en cuenta el efecto de los buffers de unión, el pH y la concentración de iones como así también el tipo de bloqueante de la nitrocelulosa. Encontramos que los perfiles de proteínas que unen ADN varían de un tipo celular a otro pero ciertas estrategias o criterios de selección son aplicables a cualquiera y permiten ayudar a determinar si una proteína es seleccionable dentro de una mezcla compleja. También estudiamos proteínas catiónicas, que basalmente unen ADN, como caso extremo de blanco proteico de aptámeros. Proponemos además un uso proteómico del ADN. Agradecimientos UCA

GENÉTICA 1

058 (72) ¿SON LOS GENES CHRNA9 Y CHRNA10 RESPONSA- BLES DE FILTRAR EL RUIDO AMBIENTAL? ESTUDIO EN PACIENTES CON FALTA DE DISCRIMINACIÓN AUDITIVA EN AMBIENTE RUIDOSO

Buonfiglio, Paula; Lotersztein, Vanesa; Elgoyhen, Ana Belen; Dalamon, Viviana
INGEBI

La pérdida auditiva tiene una incidencia de 1:1000 nacidos vivos, y el 50% es de causa genética. Sin embargo, existe un subgrupo de pacientes que acuden a la consulta audiológica pero no desarrollan hipoacusia, sino que presentan dificultad de discriminar los sonidos principalmente en ambientes ruidosos. Estos pacientes suelen permanecer sin tratamiento ni diagnóstico. El sonido percibido es traducido a una señal aferente que es transmitida al SNC, y es regulada por una vía eferente descendente inhibitoria, que podría ser activada durante las tareas de comportamiento con atención a un foco, al atenuar los estímulos auditivos percibidos en el entorno. Un débil funcionamiento del sistema eferente se correlacionaría con una pobre detección del tono en ambientes ruidosos. El objetivo del trabajo es identificar los causales genéticos relacionados con la dificultad discriminativa en ambientes ruidosos. Para ello analizamos los genes CHRNA9 y CHRNA10 que codifican para las subunidades alfa-9 y alfa-10 de receptores colinérgicos nicotínicos del sistema eferente, como potenciales candidatos genéticos. Se seleccionaron 15 pacientes con falta de discriminación de sonido en ambientes ruidosos. Se secuenciaron en forma completa los genes CHRNA9 y CHRNA10. Las secuencias obtenidas se compararon con la secuencia de referencia junto con un grupo control de 50 individuos. En total se detectaron 27 variaciones de secuencia. Como primera aproximación descartamos las variaciones exónicas sinónimas y las intrónicas reportadas con alta frecuencia en la base de datos 1000genomes. Dos mutaciones continúan en estudio como candidatas a ser causales de la patología en nuestros pacientes: p.T77N (en exón 3 de CHRNA10) y p.C169R (en exón 4 de CHRNA9). Ambas resultarían patológicas in-silico mediante los programas SIFT y Polyphen. Se encuentran en proceso los experimentos funcionales para establecer su efecto en la proteína.

059 (95) ANÁLISIS DE LA REPETICIÓN G4C2 DEL GEN C9ORF72EN UNA COHORTE DE PACIENTES CON DEMENCIA FRONTOTEMPORAL O ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA DE ARGENTINA

Tatiana Itzcovich[2]; Patricio Chrem-Méndez[3]; Bruno De Ambrosi[4]; María Julieta Russo[3]; Emanuel Silva[5]; Jorge Campos[3]; Martín Nogués4; Osvaldo Uchitel[4]; Ricardo Allegri[3]; Horacio Martinetto[2]; Gustavo Sevlever[2]; Ezequiel I. Surace[2]
Laboratorio de Biología Molecular, FLENI[2] Centro de Memoria y Envejecimiento, FLENI[3] Clínica de Esclerosis Lateral Amiotrófica, FLENI[4] Hospital Escuela de Agudos Dr Ramón Madariaga, Posadas, Misiones[5]

La expansión en el número de repeticiones del hexanucleótido G4C2 en el primer intrón del gen C9ORF72 (localizado en el cromosoma 9p21) es la causa genética más común tanto en Esclerosis lateral amiotrófica (ELA) como en Demencia frontotemporal (DFT). La DFT representa una entidad heterogénea

caracterizada por cambios en el comportamiento y el lenguaje debido a una neurodegeneracion de los lóbulos frontal y temporal, mientras que la ELA está caracterizada por una degeneración progresiva de motoreuronas en el cerebro y la medula espinal. Sin embargo, y debido a una causa genética común, se puede observar cierto solapamiento clínico-patológico. El propósito del trabajo fue analizar una cohorte de pacientes de ELA y DFT de Argentina determinando el número de repeticiones G4C2. Para ello, se obtuvieron, con la aprobación del comité de ética institucional, muestras de ADN a partir de leucocitos de sangre periférica de 33 pacientes con DFT y 49 pacientes con ELA. El 48,5% de los pacientes con DFT y el 4% de los pacientes con ELA, presentaron antecedentes familiares de la patología. La genotipificación se realizó llevando a cabo un análisis de AFLP ("amplified fragment length polymorfism") y una RP-PCR ("repeat primed PCR") en el caso de tener que determinar la presencia de expansión. Los resultados mostraron que la frecuencia de expansión de G4C2 en C9ORF72 fue del 18,2% para DFT hereditaria y del 2% para ELA esporádica. Para DFT, la frecuencia de nuestra población fue similar a la reportada para otras poblaciones (ej. de EEUU y Europa), mientras que para ELA esporádica, la frecuencia fue menor (2% vs 5,5% en otras poblaciones). En conclusión, este trabajo representa el primer reporte en Argentina sobre la frecuencia de expansión en C9ORF72 en una cohorte de ELA y DFT.

060 (118) IMPORTANCIA DE LA UTILIZACIÓN DE LAS DIFERENTES TÉCNICAS MOLECULARES PARA EL CORRECTO DIA-GNOSTICO Y ASESORAMIENTO GENÉTICO DEL SÍNDROME DE RETT

Samara, Maríana Cecilia; Cantarella, M. Florencia; Capelli, Maríana; Loreti, Nazareth; Speche, Lucia; Ferreiro, Verónica
GENOS S.A.

El síndrome de Rett es un trastorno genético del sistema nervioso que lleva a una regresión en el desarrollo, especialmente en las áreas del lenguaje expresivo y de movimiento de las manos. En su forma clásica se presenta como dominante ligada al X, produciéndose por mutaciones en el gen MECP2 (Xq28). El Rett atípico, de aparición tardía y más leve, se produce por mutaciones en los genes ARX (Xp21.3), CDKL5 (Xp22.13), NTNG1 (1p13) y FOXG1 (14q12). El diagnóstico molecular de la patología se realiza principalmente mediante la secuenciación directa de los exones 2, 3 y 4 del gen MECP2, ya que las mutaciones puntuales en esta zona del gen representan la alteración molecular más frecuente responsable del Síndrome. La técnica de MLPA (amplificación múltiple de sondas ligadas) permite, en una segunda instancia, poner en evidencia deleciones o duplicaciones en gen MECP2 y en algunas zonas de los genes implicados en el Rett Atípico. Por último, la técnica de Microarrays Cromosómico aportaría una visualización más global de los defectos genéticos en los pacientes analizados. Se analizaron 26 muestras de pacientes con sospecha clínica de Síndrome de Rett. La estrategia diagnóstica planteada permitió hallar la alteración molecular en 4 niñas. Tres de ellas presentaron mutaciones puntuales en el gen MECP2 que habían sido previamente reportadas en la Rett Base (http://mecp2chw.edu.au). La última niña no presentó mutaciones puntuales en el gen MECP2, ni mostró alteraciones en un estudio de Microarrays. Sin embargo, el estudio de MLPA reveló una deleción completa del exón 3 y parcial del exón 4, en el gen MECP2 (c.27_?_1029+?del) p.R9fs. Se quiere demostrar la importancia de la utilización de una estrategia diagnóstica particular mediante el uso conjunto de numerosas técnicas moleculares para la resolución de casos clásicos y atípicos de Síndrome de Rett, con el objeto de brindar el correcto asesoramiento genético a las familias implicadas.

061 (142) DISTRIBUCIÓN DE LAS MUTACIONES DE KRAS EN CÁNCER COLORRECTAL EN POBLACIÓN ARGENTINA

Santiago David Molinas Zocche[1]; Fernando Martin Fontao[1]; Carolina Ramirez[2]; Lucas Damian Costa[2]; María Ana Redal[1]
Hospital Italiano de Buenos Aires[1] Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental[2]

Introducción: El establecimiento de las terapias dirigidas anti-EGFR en el tratamiento de primera línea del cáncer colorrectal estadio IV (CCR) llevó a la implementación de análisis de KRAS en pacientes previo a la terapia, ya que los pacientes con mutación no responden a las mismas. No está reportada la distribución de las mutaciones en nuestra población, por lo que no contamos con datos sobre sus características y su frecuencia. Objetivo: Determinar la frecuencia de mutaciones en el oncogén KRAS en pacientes con CCR operados en el Hospital Italiano de Buenos Aires(HIBA) y establecer los distintos subtipos de mutación. Correlacionar esto con las características clínicas de los pacientes. Materiales y métodos: El análisis de la mutación de KRAS se realizó a partir de piezas quirúrgicas de resección del tumor primario de pacientes operados en el HIBA. Se extrajo el ADN a partir del tejido fijado en parafina, se amplificó por técnica de PCR y posterior secuenciación bidireccional por método de Sanger. Se tipificaron las mutaciones, se determinó su tipo y frecuencia. Se registraron características clínicas de los pacientes. Finalmente se procedió a su análisis estadístico. Resultados: Del total de los 272 pacientes estudiados, en 87 (32%) se ha detectado mutación en KRAS. Las mutaciones ocurrieron con una frecuencia de 75% (63) en el codón 12 y 25% (21) en el codón 13. El tipo de mutación más frecuente fue G12D con 24 casos, representando un 30% del total de mutaciones. El análisis estadístico no demostró correlación significativa entre las variables clínicas y la mutación de KRAS. Conclusiones: La frecuencia de mutación de KRAS y la distribución de los diferentes subtipos en la población estudiada de Argentina, se asemeja a la reportada en otras poblaciones. Las características clínicas no se han asociado de manera significativa al perfil mutacional de los pacientes, sugiriendo que ambas variables se comportan de manera independiente.

062 (175) MUTACIONES NO COMUNES HALLADAS EN PACIENTES CON RETINOBLASTOMA

Irene Szijan[1]; Luce Leonela[1]; Giliberto Florencia[1]; Ferrer Marcela[2]; Parma Diana[1]
Cátedra de Genética, Fac. Farm y Bioq. UBA[1] Neurobiol. Molec. Hospital de Clinicas José de San Martín[2]

El retinoblastoma (RB) es el cáncer ocular más común en la niñez. Puede ser unilateral o bilateral, los casos bilaterales tienen una mutación germinal, los unilaterales en su mayoría (80%): mutaciones somáticas, no son hereditarios. El objetivo es identificar mutaciones en pacientes con RB, determinar su carácter hereditario y predecir el riesgo en familiares. Se analizó el ADN constitucional (leucocitos) y algunos tumorales de 2 pacientes con RB bilateral y 5 con RB unilateral esporádico. Se analizaron las secuencias exonicas del gen RB1 y los grandes rearreglos. El análisis de ADN constitucional mostró varios hallazgos interesantes: I. Una mutación germinal en 2 de 5 pacientes unilaterales, siendo lo más común las mutaciones somáticas. II. En los 2 pacientes bilaterales la mutación causante de RB fue una sustitución de G>A en el sitio de empalme de exones 1 y 2, (publicada solo 2 veces). La consecuencia esperada (análisis "in silico") es un salteo del exón 1. III. En un paciente unilateral se identificó una mutación germinal "missense" en un dominio proteico conservado, siendo estas mutaciones raras en RB; en otro paciente unilateral se encontró deleción de adenina en una secuencia repetida en el exón 9. IV. Se identificó en el ADN constitucional una inserción de 21pb en el exón 20 de dos pacientes, uno bilateral y otro unilateral. Ambos pacientes presentaban además otra mutación: una sustitución de G>A y una deleción de A (ver arriba). Esta inserción es una duplicación de 9pb corriente arriba más otra duplicaición de 12pb y podría ser no patogénica por no producir corrimiento del marco. Otra particularidad es su presentación heterocigota en mosaico en el paciente unilateral. Esta mutación no descripta antes fue hallada en dos pacientes no relacionados. Conclusiones: se identificaron mutaciones en el gen RB1 y se analizó su significado biológico para determinar si son la causa del tumor. Se pudo predecir el riesgo en los familiares de los pacientes.

063 (270) REARREGLO COMPLEJO DEL F8 ASOCIADO A DEFECTOS EN LA REPLICACIÓN DEL ADN POR ``FORK

STALLING-TEMPLATE SWITCHING`` (FOSTES) COMO CAUSA DE HEMOFILIA A SEVERA SIN INHIBIDOR

Martin Abelleyro[1]; Liliana Rossetti[1]; Tomas Tetzlaff[3]; Pamela Radic[1]; Vanina Marchione[1]; Irene Larripa[1]; Carlos De Brasi[12]
IMEX[1] IHEMA[2] UNGS[3]

Las grandes deleciones y los rearreglos complejos del F8 son causa de hemofilia A severa (HAs) y predisponen al desarrollo de inhibidores terapéuticos, anti-FVIII. Este trabajo presenta la caracterización molecular completa de un gran rearreglo complejo del F8 (compuesto por la concurrencia de 3 deleciones, 2 inserciones y 1 inversión) detectada por ausencia consistente de amplificación del promotor y el exón 1 del F8 en un paciente con HAs sin inhibidor. Para caracterizar este defecto se estudiaron las regiones 5' y el F8 IVS1 involucradas por un abordaje de análisis de acercamiento por bipartición. Se estudiaron 6 amplímeros río-arriba del F8 (a 100, 50, 25, 12, 6 y 3kb) y 3 amplímeros en el F8 IVS1 (IVS1, IVS1IU, IVS1ID) resultando todos positivos en el paciente hemicigota salvo los amplímeros de 3kb e IVS1ID. La amplificación PCR de larga distancia desde el producto de F8-3,5kb hasta el F8-IVS1 rindió una señal específica del alelo mutado de ≈2kb cuyo análisis de restricción múltiple permitió diseñar primers (F8-3,5kb y F8-IVS1) para la amplificación estándar de la deleción, su caracterización y el diagnóstico molecular directo del paciente, su hermano, madre y hermana. La secuenciación de Sanger del producto de 362bp permitió caracterizar un rearreglo complejo de 23.477bp (ChrX:154253881-154230138), notación HGSV, NM_000132.3:c.[-3056_143+12716del15914{-3056_-3057insGGTCTCG}; 143+12761_143+14363del1602; 143+14363_143+14425inv; 143+14425_143+20543del6118{143+14425_143+14426insCCTGGCTA}]. Este rearreglo del F8 presenta tres deleciones discontinuas, una inversión y dos inserciones (de 7 y 8bp) en sus extremos. Los 4 sitios de ruptura involucrados en la recombinación compleja presentan elementos Alu (AluY, AluS y AluJ). La complejidad estructural de este rearreglo es consistente con el mecanismo FoSTeS (Fork Stalling-Template Switching) por defectos en la replicación del ADN.

064 (281) EXPLORANDO LAS CAUSAS DE LA INACTIVACIÓN SESGADA DEL CROMOSOMA X. ANÁLISIS GENÉTICO DE XIST EN CASOS Y CONTROLES

Emilce Mora[1]; Radic Claudia P[1]; Giliberto Florencia[2]; Rossetti Liliana[1]; Abelleyro Miguel M[1]; Marchione Vanina D[1]; Szijan Irene[2]; Larripa Irene B[1]; De Brasi Carlos D[1]
IMEX[1] Fac. de Farmacia y BioQuímica[2]

La inactivación al azar de uno de los dos cromosomas X en mujeres permite compensar la dosis génica con varones XY. La inactivación del X (XCI) sesgada es una marcada desviación del 50% y entre otras causas puede asociarse a deleciones sobre el gen XIST (X-inactivation specific transcript) responsable de la iniciación y el mantenimiento del XCI. La presencia de variantes tipo SNP (single nucleotide polymorphism) podrían modificar la expresión del XIST y su función. Objetivo: Identificar variantes genéticas del XIST asociadas a XCI sesgado. Población: 22 mujeres, 11 casos (con XCI sesgado 90-100%) y 11 controles (con XCI al azar 50-55%). En el primer grupo, se incluyeron mujeres portadoras y no-portadoras, sintomáticas y no-sintomáticas de hemofilia A y distrofia muscular de Duchenne. Se realizó un screening genético del XIST por CSGE (conformation sensitive gel electrophoresis) y secuenciación de Sanger. Se analizó la región regulatoria XIST (8 amplímeros), los sitios de splicing y exones del 2 al 5 completos (64, 137, 209 y 164pb, 4 amplímeros) y parcialmente los exones 1 (11372pb) y 6 (7325pb) incluyendo sólo las regiones con SNPs de frecuencias alélicas relevantes (8 amplímeros). El análisis de los 440 amplímeros no mostró mutaciones nuevas, sino 7 variantes alélicas de los 81 SNPs anotados en el XIST. Los OR (odds ratio) indicaron 2 SNPs potencialmente protectores $0.30 \leq OR \leq 0.33$ (rs1794213; rs1620574, exón 6); un SNP neutro OR=1 (rs41305409, región regulatoria) y cuatro SNPs potencialmente asociados a sesgo $2.6 \leq OR \leq 3.8$ (rs6527, exón 1; y rs16992443, rs16992436 y rs16992442, exón 6). Éste es el primer estudio genético tipo caso/control del XIST sobre la propensión a sesgar la XCI realizado hasta el presente. Si bien no se observaron diferencias significativas en este estudio, la ampliación del número de controles (≥ 44) y la extensión de las regiones bajo estudio permitirá la elucidación de alguna de las causas de sesgo en la XCI.

065 (492) ASOCIACIÓN ENTRE UNO DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN QUE CODIFICA PARA EL RECAPTADOR DE SEROTONINA (SLC6A4) Y LA CONDUCTA SUICIDA

Ángeles R. Arena[1]; Arnaldo R. Armesto[1]; Soledad Puppo[3]; Leandro Grendas[2]; Federico Rebok[2]; Demián Rodante[2]; Agustina Fógola[1]; Andrea E. Errasti[1]; Federico M. Daray[1]
Instituto de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA.[1] Hospital Neuropsiquiátrico, "Braulio A. Moyano", Ciudad de Buenos Aires[2] Hospital de Clínicas "José de San Martín", Ciudad de Buenos Aires[3]

El gen que codifica para recaptador de serotonina ha sido asociado a diferentes trastornos psiquiátricos. La activación transcripcional del mismo está modulada por un elemento polimórfico repetitivo, que consiste en una inserción/deleción de 44 pares de bases en la región promotora. Este polimorfismo consta de dos alelos denominados L (long) y S (short), que difieren en la actividad transcripcional y en la eficiencia del funcionamiento del recaptador. El presente proyecto tiene como objetivo evaluar la asociación entre la conducta suicida y uno de los polimorfismos del promotor del gen SCL6A4 (gen codificante para el transportador de la serotonina). Se incluyeron 37 pacientes que fueron hospitalizadas por presentar un intento de suicidio en dos Hospitales de la Ciudad de Buenos Aires. Las pacientes fueron evaluadas mediante una entrevista estructurada realizada por psiquiatras del equipo de investigación. Se definió como conducta suicida a todo acto autodestructivo en el que el paciente tenía intención de terminar con la vida. Para determinar los polimorfismos, se extrajo DNA genómico. La presencia de los alelos L y S se analizó por PCR en geles de agarosa. Se identificaron 3 genotipos SS, LS y LL a los cuales se les aplicó el análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg. Como comparador se incluyeron 106 muestras de una base genética poblacional. El estudio fue aprobado por un Comité de Ética y todas las pacientes dieron su consentimiento informado por escrito. El análisis estadístico de chi2 cuadrado de los datos no mostró una asociación significativa entre el genotipo y el intento de suicidio; sin embargo, al hacer un análisis no paramétrico de correspondencia se observó una tendencia de asociación entre el genotipo LL y el intento de suicidio. Este resultado sugiere posible asociación entre ambas variables, e indica que es necesario aumentar el tamaño muestral con el objetivo de definir si este polimorfismo está asociado o no a la conducta suicida.

066 (530) COMPOSICIÓN GENÉTICA DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR EN ARGENTINA EN RELACIÓN A LOS PAÍSES MIEMBROS DE LA RED IBEROAMERICANA DE HF

Virginia G Bañares[12]; Ana C Alves[32]; Rodrigo Alonso[42]; Cinthia Jannes[52]; Ana M Medeiros[32]; Pablo Corral[2]; Nicolás Delloca[62]; María B Araujo[2]; Gerardo Elikir[2]; X Reyes[72]; Ada Cuevas[42]; Alejandra Vázquez-Cárdenas[72]; Mario Stoll[62]; Raúl Santos[52]; Pedro Mata[82]; Laura E Schreier[92]; Mafalda Bourbon[32]
Centro Nac de Genética Médica, ANLIS-MALBRAN, Argentina[1] Red Iberoamericana de Hipercolesterolemia Familiar[2] Instituto Nac de Saúde Dr R Jorge; e BioISI, Universidad de Lisboa, Portugal.[3] Nutrición Clínica, Clínica Las Condes, Santiago, Chile[4] InCor, Universidad São Paulo, Med School Hospital, Brazil.[5] Programa GENYCO, Comosión Honoraria para la Salud CardioVascular, Montevideo, Uruguay[6] Fac de Medicina, Universidad Autónoma de Guadalajara, México[7] Fundación Hipercolesterolemia Familiar, Madrid, España[8] Lab de Lípidos y Aterosclerosis, Facultad Farmacia y Bioquímica, Univ de Buenos Aires, Argentina.[9]

La enfermedad cardiovascular (EC) es la principal causa de muerte en Argentina y el mundo y las dislipidemias un importante factor de riesgo, en especial las hipercolesterolemias. La Hipercolesterolemia Famliar (HF) esta subdiagnosticada y subtratada en la mayoría de los países. En Iberoamérica se estiman 3 millones de portadores de HF que, detectados en forma temprana, podría prevenirse en ellos la EC. El estudio genético permite la identificación temprana. Brasil, Chile, España, Méjico, Portugal, Uruguay y Argentina integran hoy la Red Iberoamericana de HF (IBA). El objetivo de este trabajo es caracterizar la composición genética de la HF en los países IBA. Métodos: revisión de publicaciones e información genética inédita de países IBA. Genes estudiados, LDLR, APOB y PCSK9. En Argentina: LDLR: secuenciación exónica y MLPA; APOB, parte exones 26 y 29. Análisis In silico. Resultados: más de 9000 pacientes IBA principalmente de España, Portugal y Uruguay: 8, 3 y 2% de los portadores estimados respectivamente; homocigotas estimados detectados; 0%Chile - 80%Portugal. En Argentina; 30 casos, 5 homocigotas. Mutaciones en el LDLR: >90% en los 7 países; en APOB: 3, 3.5 y 5% en Brasil, España y Portugal respectivamente, países con todo APOB secuenciado; la mutación más frecuente, R3527Q-exón 26, en los 7 países; en PCSK9: 1% en España y Portugal, ninguna en Brasil y Uruguay, únicos países con este gen estudiado. En Argentina identificamos 13 mutaciones diferentes, 12 en LDLR; 2 presentes en más de un caso índice y 4 nuevas. Las variantes presentes en más de un país fueron 10: c.-135C>G, c.12G>A, c.274C>G; c.313+1G>C, c.530C>T, c.662A>G, c.1285G>A, c.1291G>A, c.1775G>A, c.2043C>A. Rango de la tasa genética/clínica: 30-70%, Argentina 70%. Conclusión; los países IBA comparten siglos de historia y probablemente muchos alelos HF, aquí describimos los 10 primeros. El análisis integrado de HF en IBA contribuirá al conocimiento sobre la genética de la enfermedad.

067 (618) CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN DE LA DISTROFINA EN UNA POBLACIÓN PEDIÁTRICA ARGENTINA

María E Foncuberta[1]; Soledad Monges[1]; Fabiana Lubieniecki[1]; Jonàs Juan-Mateu[2]; Angélica Moresco[1]; María Gabriela Obregón[1]; Pía Gallano[2]; Lilien Chertkoff[1]
Hospital de Pediatría Prof. Dr Juan P. Garrahan[1] Servicio de Genética, Hospital de La Santa Creu I Sant Pau, Barcelona, España[2]

Las distrofinopatías son un grupo de enfermedades hereditarias causadas por mutaciones en el gen DMD localizado en el cromosoma X (Xp21.2); abarcan a la distrofia muscular de Duchenne (DMD), la distrofia muscular de Becker (DMB) y la cardiomiopatía dilatada ligada al cromosoma X (CDLX). Las mutaciones en el gen DMD incluyen deleciones (65%), duplicaciones (5-10%) y mutaciones puntuales (25-30%). Aún no existe un tratamiento eficaz a largo plazo para este grupo de enfermedades. Varias terapias génicas se encuentran actualmente en desarrollo, entre ellas la terapia antisentido y la reversión del codón stop prematuro. Conocer el espectro y la frecuencia de las mutaciones en el gen DMD resulta de fundamental interés para la incorporación de pacientes en protocolos de investigación y para el desarrollo nuevos blancos terapéuticos. Objetivo: describir la frecuencia de mutaciones en niños con DMD/DMB. Describir las mutaciones potencialmente tratables en nuestra población. Metodología: se estudiaron 282 pacientes varones con una mediana de edad 8,42 años (r: 4 m -21 a) con sospecha clínica de distrofinopatía mediante la técnica de MLPA. En 43 pacientes con MLPA negativo, con clínica y biopsia compatible con DMD/BMD se secuenció el gen DMD (Sanger y NGS). Resultados: 218/282 (77,3%) presentaron mutaciones en el gen DMD. Se estimó la frecuencia y tipos de mutaciones en 200 pacientes (18 familiares excluidos); 133 presentaron deleción, 22 duplicaciones y 45 mutaciones puntuales (51% sin sentido, 29% pequeñas deleciones, 9% splicing, 7% inserciones, 4% cambio de sentido). El 44,5% de los pacientes con deleciones podrían restaurar el marco de lectura con el skipping de un único exón y 11,5% por la reversión de codón stop prematuro (mutaciones sin sentido). Conclusión: este estudio contribuye a la descripción del perfil de mutaciones en el gen DMD en población argentina y a detectar pacientes con mutaciones potencialmente tratables con las nuevas terapias génicas.

069 (640) IMPLICANCIA DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN DE RESISTENCIA A MULTIDROGAS (MDR1) EN EL DESENCADENAMIENTO DE LA PORFIRIA CUTÁNEA TARDÍA EN INDIVIDUOS CON VIH

Johanna Zuccoli[1]; Viviana Melito[12]; Jimena Lavandera[3]; Silvina Ruspini[1]; Victoria Parera[1]; Alcira Batlle[1]; María Victoria Rossetti[1]; Ana María Buzaleh[12]
CIPYP[1] Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA[2] Cátedra de Bromatología y Nutrición, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL, Santa Fe[3]

El nivel de expresión y la actividad biológica del gen de Resistencia a Multidrogas 1 (MDR1) afecta la farmacocinética de numerosos xenobióticos y antirretrovirales. Se han identificado 50 polimorfismos de nucleótido simple (SNP) de este gen, tres de ellos de alta frecuencia en los exones 26, 21 y 12. La Porfiria Cutánea Tardía (PCT) se desencadena por distintos factores incluyendo fármacos y drogas de abuso. En nuestro país el 17% de los PCT son portadores del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Previamente se genotipificó el exón 26 (c.3435C>T) en individuos control, con PCT y PCT-VIH observándose diferencias significativas en la frecuencia alélica entre el grupo control y los otros grupos, indicando una mayor prevalencia de la mutación en individuos con PCT. Estos resultados indicarían una posible influencia de este polimorfismo en el desencadenamiento de la PCT independientemente de la infección por VIH. El objetivo fue continuar estudiando la incidencia del polimorfismo del gen MDR1 en la asociación PCT/VIH, genotipificando los exones 21 (c.2677G>T/A) y 12 (c.1236 C>T) en dicha población por PCR-RFLP y evaluando la existencia de haplotipos (1236T-2677T/A-3435T) mediante el programa SNPStats. La frecuencia alélica fue: exón 21: 0,45 (control, n=40); 0,48 (PCT, n=41) y 0,62 (PCT-VIH, n=34); exón 12: 0,33 (control, n=39); 0,59 (PCT, n=29) y 0,35 (PCT-VIH, n=39). Se observaron diferencias significativas ($p<0,05$) entre control vs PCT-VIH (exón 21) y control vs PCT y PCT vs PCT-VIH (exón 12). Analizando los haplotipos, la frecuencia de CCG (*wild type*) predominó en el grupo control mientras que TTT (polimórfico) se encontró en segundo lugar. En los grupos PCT y PCT-VIH esta relación estaba invertida. Los resultados evidencian una posible asociación del desencadenamiento de la PCT a la exposición a drogas en general y otros factores causantes de daño hepático, aunque no específicamente a la terapia antirretroviral.

070 (647) DIABETES TIPO MODY SUBTIPOS 2 Y 3 EN ARGENTINA. ACTUALIZACIÓN DE PREVALENCIA Y REPORTE DE NUEVOS HALLAZGOS

Ariel Pablo López[1]; Sofia Trobo[1]; Alejandro De Dios[1]; Ignacio Chiesa[2]; María Silvia Perez[2]; Gustavo Daniel Frechel[1]
Htal. de Clinicas Gral. San Martin[1] Laboratorio Manlab[2]

Introducción: las Diabetes tipo MODY se producen por alteraciones en distintos genes de expresión pancreática. Los subtipos 2 y 3 se producen por alteraciones el gen de la glucoquinasa y el del factor nuclear hepático 1 alfa, relacionados con el metabolismo de la glucosa. Estos pacientes tienen algunas características clínicas similares y otras diferenciales entre si y con respecto a los otros tipos de Diabetes. Objetivos: analizar en un grupo de pacientes clínicamente caracterizados como MODY2 y 3 la presencia de alteraciones en los genes respectivos con el objeto de diagnosticar a estos individuos como MODY en primera instancia y el subtipo presente en segundo término. Por otro lado, analizar la frecuencia de estos tipos de Diabetes en la población nacional y conocer el tipo de mutaciones presentes asi como también realizar un aporte tanto de las particularidades de las mutaciones halladas como de las características de la herencia familiar de las mismas. Métodos: se genotipificaron 38 pacientes con características clínicas de MODY2 y otros 24 con características clínicas de MODY3, no relacionados y sus familiares directos con o sin clínica de Diabetes. Para ello se realizó la secuenciación automatizada de los productos de amplificación de los genes 1a y del 2

al 10 de la glucoquinasa y del 1 al 10 de HNF1a. Resultados: se diagnosticaron 22 pacientes con MODY2 y 6 con MODY3 en esa población. Se confirmó la herencia autosómica dominante de estos tipos de diabetes salvo en dos casos. Entre todas las familias estudiadas existió correlación entre el genotipo encontrado y el fenotipo observado. Se determinaron las prevalencias, siendo de 57,89% del subtipo 2 y un 25.00% del subtipo 3. Conclusión: se logró diagnosticar un grupo de estos pacientes lo que permitirá instituirles un correcto tratamiento y un asesoramiento genético familiar. Se actualizaron además los datos de prevalencia y de herencia en nuestra población de este tipo de Diabetes.

METABOLISMO Y NUTRICIÓN 1

071 (12) EVALUACIÓN DE PARÁMETROS METABÓLICOS Y DEL ESTADO OXIDATIVO HEPÁTICO EN RATAS MACHO SOMETIDAS A UNA DEFICIENCIA MODERADA DE ZINC

Facundo Mendes Garrido[1]; Franco Brunello[1]; Julieta Gondolesi[1]; Diego Lucero[2]; Laura Schreier[2]; Analía Tomat[1]; Cristina Arranz[1]
Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. IQUIMEFA-CONICET.[1]Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis, Depto. Bioq. Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA[2]

La deficiencia de zinc durante la vida fetal y la lactancia induce un aumento de la presión arterial y alteraciones cardiovasculares y renales en ratas macho adultas. El objetivo fue evaluar parámetros metabólicos séricos y el estado oxidativo en el hígado de ratas sometidas a una deficiencia moderada de zinc. Ratas Wistar hembras recibieron dieta baja en zinc (B,8ppm) o control (C,30ppm) durante la preñez hasta el destete (día 21). Las crías macho continuaron con dieta B o C durante 60 días post-destete (CC, BB y BC). Al día 74 de vida, se obtuvo una muestra de sangre luego de un ayuno de 12 hs para determinar la glucemia y el perfil lipídico en suero. A los 81 días de vida se evaluó la morfología y el estado oxidativo hepático. Análisis estadístico: ANOVA, test a posteriori Bonferroni (n=6/grupo).

	CC	BB	BC
Glucemia (mg/dL)	130±6	154±5*	128±5
Trigliceridemia (mg/dL)	114±8	152±14*	115±7
Colesterol total/c-HDL	1,32±0,2	1,35±0,2	1,35±0,2
TBARS (pmolMDA/mg prot)	33±4	38±5	31±6
CAT (pmol/mg prot)	2,1±0,1	3,1±0,3*	2,3±0,1
SOD (USOD/mg prot)	3,2±0,3	3,3±0,4	3,2±0,4

TBARS: Especies reactivas del ácido tiobarbitúrico; CAT: catalasa; SOD: superóxido dismutasa. *p<0,05 vs BC y CC. Las ratas BB presentaron un aumento de la glucemia y la trigliceridemia, así como una mayor actividad de la enzima antioxidante CAT hepática, que permitiría probablemente compensar el daño oxidativo inducido por esta injuria nutricional. El contenido adecuado en zinc durante el crecimiento post-destete revirtió estos cambios. No se observaron alteraciones morfológicas ni cambios en el contenido de colágeno en los cortes histológicos de hígado teñidos con hematoxilina-eosina y Sirius red respectivamente. La deficiencia de zinc desde la vida fetal hasta la adultez produce elevación de la presión arterial, la glucemia y la trigliceridemia en ratas macho que contribuirían al desarrollo de síndrome metabólico en la vida adulta.

072 (20) LA SEMILLA DE SALVIA HISPÁNICA L (CHIA) DIETARIA MEJORA LAS DEFENSAS ANTIOXIDANTES, CITOQUINAS INFLAMATORIAS Y EL ESTRÉS OXIDATIVO DEL TEJIDO ADIPOSO DISFUNCIONAL DE RATAS DISLIPÉMICAS INSULINO RESISTENTES

María Del Rosario Ferreira Cordoneda[1]; Silvina Alvarez[2]; Paola Illesca[1]; Ma. Sofia Gimenez[2]; Yolanda B. Lombardo[1]
Dpto. de Cs. Biológicas. Lab. de Enfermedades relacionadas con la Nutrición. FBCB. UNL[1] IMIBIO-SL CONICET UNSL[2]

El objetivo del presente trabajo es evaluar el posible efecto beneficioso de la semilla de chía (rica en ácido α-linolénico (18:3, n-3) sobre algunos mecanismos involucrados en la disfunción del tejido adiposo (TA) de ratas dislipémicas insulino resistentes inducida por ingesta crónica (6 meses) de una dieta rica en sacarosa (DRS). Para lograr este objetivo se evaluaron: defensas antioxidantes, citoquinas inflamatorias y estrés oxidativo. Metodología: Ratas Wistar recibieron durante 3 meses DRS (p/p 62,5%). Luego, la mitad de los animales continuó consumiendo DRS mientras que en la otra mitad el aceite de maíz (AM) como fuente de grasa dietaria se reemplazó por semilla de chía durante 3 meses adicionales. Un grupo de referencia recibió dieta control durante todo el período experimental. Se determinó: a) El índice de adiposidad visceral y en plasma niveles de Triglicéridos, AGNE, glucosa, insulina, ácido úrico, TBARS y de las citoquinas leptina, TNF-α, IL-6.b) En tejido TA epididimal: 1-actividades enzimáticas: xantina oxidasa (XO), glutation peroxidada (GPx), glutation reductasa (GR), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT); y la expresión génica de GPx, SOD y factor de transcripción Nrf2. 2- Estado Redox del glutation (ER) Resultados: la semilla de chía: 1-Corrige lo niveles plasmáticos de lípidos, glucosa, insulina, ácido úrico, leptina, TNFα e IL-6 y reduce los niveles de TBARS (p<0,05); 2-Normaliza /mejora las actividades enzimáticas XO, CAT, GR y el ER. La expresión génica de GPx incrementa normalizándose su actividad. Expresión y actividad SOD alcanzan valores controles y se observa un incremento (p<0.05) de la expresión del Nrf2. Conclusión: Los resultados sugieren posibles mecanismos involucrados en el efecto beneficioso de la semilla chia sobre la reducción de la adiposidad visceral y disfunción del tejido adiposo en este modelo experimental que mimetiza en numerosos aspectos bioquímico- metabólicos al síndrome metabólico del humano.

073 (90) MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

Paula M González[1]; Cecilia Ramos[2]; María E Antona[2]; Silvia M Friedman[2]; Eisa V Macri[2]; Susana Puntarulo[1]
Fisicoquímica-IBIMOL, FFyB, UBA-CONICET[1] Bioquímica General y Bucal, FO, UBA[2]

En la enfermedad periodontal (EP) el biofilm bacteriano induce una respuesta inmunoinflamatoria que desencadena estrés oxidativo, nitrosativo y daño celular con pérdida de soporte dentario. El objetivo del trabajo fue analizar, en ratas Wistar adultas, la actividad de la NADPH diaforasa (NOS-like) y el contenido de radicales lipídicos (RL•) durante el desarrollo de EP. La EP se indujo mediante ligadura de hilo del 1° molar de la hemimandíbula derecha (EP+L) bajo anestesia (n=24). El molar contralateral se usó como control no tratado (C-EP). En el tejido gingival se efectuaron determinaciones al cabo de 0 (controles, C), 48, 72 h y de 1, 2 y 4 semanas post ligadura. El contenido de RL•, determinado por resonancia paramagnética electrónica (EPR), en controles (113±6 pmol/mg PF) aumentó significativamente a la semana 1 de la EP (173±14 pmol/mg PF, ANOVA p<0,05) y retornó a los valores controles en los restantes tiempos estudiados. La actividad de la enzima NOS-like, medida por espectrofotometría, resultó de 22,6±0,6 UA/µg prot min en C, y de 129±12 y 52±6 UA/µg prot min, p<0,0001 y p<0,001; en EP+L a las 72 h y a 1 semana, respectivamente; volviendo a los valores C a las 2 semanas de tratamiento. En C-EP no se verificaron cambios en la actividad NOS-like con respecto a C; sin embargo, el contenido de RL• se incrementó significativamente al cabo de 1 semana (164±19 pmol/mg PF, p<0,05) no observándose cambios a las 48 h, 2 y 4 semanas (86+16, 104±24 y 111+8 pmol/mg PF, respectivamente). Estos resultados que avalan la etiología multifactorial de la EP permiten concluir que: a) los marcadores de daño oxidativo y nitrosativo son herramientas útiles para evaluar las etapas en el desarrollo de la EP, y b) la actividad de la enzima NOS-like permitiría estimar efectos locales, mientras que el contenido de RL• se asociaría con un daño sistémico. En ambos casos, los efectos se pueden observar a partir de las 72 h y hasta 1 semana de generada la EP.

074 (134) EFECTO DEL FLAVONOIDE DIETARIO QUERCETINA SOBRE LA BIODISPONIBILIDAD DE ÓXIDO NÍTRICO EN TEJIDO CARDÍACO DE RATAS TRATADAS CON L-NAME

Valeria Calabro; Barbara Piotrkowski; Monica Galleano; Cesar G. Fraga
IBIMOL

La disminución de la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) es un marcador temprano de desarrollo de enfermedades cardiovasculares y se asocia con un aumento de especies activas del oxígeno. Se estudió el metabolismo del NO y del anión superóxido en tejido cardíaco de ratas deficientes en NO por tratamiento con L-NAME y su modulación por el flavonoide dietario quercetina (QC). Ratas S-D machos se dividieron en 4 grupos y recibieron durante 4 d: dieta control y agua (C); dieta control + QC (4g/kg dieta) y agua (Q), dieta control y L-NAME en el agua (360mg/L) (L) y dieta control + QC (4g/kg dieta) y L-NAME en el agua (360mg/L) (LQ). La PA final fue significativamente mayor en el grupo L y la presencia de QC en la dieta logró prevenir dicho aumento (*p<0,001). La actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) fue significativamente menor en las ratas tratadas con L-NAME (p<0,001), independientemente de la presencia o ausencia de QC en la dieta. La expresión de la isoforma inducible de la NOS (iNOS) mostró un aumento en el grupo L (p<0,05), el cual fue prevenido por el tratamiento con QC. En cuanto al metabolismo del anión superóxido, se observó una mayor actividad de la enzima NAD(P)H oxidasa (NOX) en tejido cardíaco del grupo L comparado con ratas que recibieron QC (p<0,05). Asociado a este aumento se observó una mayor expresión de p47phox (subunidad regulatoria de la NOX) en el grupo L que fue prevenida por QC (p<0,01 L vs. C y Q;p<0,05 L vs. LQ). Además, la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) fue significativamente mayor en L comparado con los otros grupos (p<0,001), retornando a valores controles en ratas LQ. Se concluye que la suplementación con QC aumentaría la biodisponibilidad de NO en tejido cardíaco de ratas tratadas con L-NAME mediante la modulación de la actividad y/o expresión de las enzimas NOX y NOS, siendo mayor su efecto sobre la regulación del metabolismo del anión superóxido.
UBACyT; CONICET; PICT

075 (160) ALTERACIONES MORFOLÓGICAS PRODUCIDAS POR EL TRATAMIENTO CON UNA DIETA ALTA EN GRASA EN LA RATA

Nahuel M. Sanchez Eluchans; H. J. Lee; J. S. Merlo; A. S. Donoso; S. M. Cantú; H. A. Peredo; A. M. Puyó
Cátedra de Anatomía e Histología, Fac. de Farmacia y BioQuímica (UBA)

Una dieta alta en grasa (DG) desarrolla resistencia a la insulina, fenómeno asociado a alteraciones metabólicas y hemodinámicas que semejan el síndrome metabólico humano. Estudiamos en dos períodos de tratamiento (8 y 12 semanas), el efecto de dicha dieta sobre parámetros metabólicos, presión arterial y la morfología del hígado y la arteria aorta de ratas Sprague-Dawley macho. Se utilizaron 4 grupos: control (C8 y C12, n=6, dieta normal); y con DG (DG8 y DG12, n=6, DG: 50% P/P de grasa bovina adicionada a la dieta normal). Los animales se sacrificaron a las 8 y 12 semanas y se midieron glucosa, triglicéridos (kits comerciales) e insulina (ELISA) en plasma. Las muestras de órganos fueron procesadas con la técnica histológica de rutina, teñidas con H - E y Sirius Red y la morfometría se realizó por análisis de imágenes. La PA sistólica (PAS) se midió por método indirecto. A partir de la semana 8 la DG aumentó el% de esteatosis (DG8, 65±18 vs. C8, 5±3; DG12, 60±16 vs. C12, 0.8±0.3, p<0.05); y de fibrosis perivascular (DG8, 32±3 vs. C8, 11±1; DG12, 26±3 vs. C12, 15±3, p<0.05) hepáticas; la glucemia (mg/dl, DG8, 149±3 vs. C8, 112±9; DG12, 141±9 vs. C12, 127±7, p<0.05); la insulinemia (ng/ml, DG8, 3.5±0.5 vs. C8, 1.6±0.2; DG12, 3.4±0.6 vs. C12, 1.1±0.2, p<0.05), la triglicéridemia (mg/dl, DG8, 110±6 vs. C8, 62±11; DG12, 177±45 vs. C12, 91±18, p<0,05 y la PAS (mmHg, DG8, 150±9 vs. C8, 125±1; DG12, 149±3 vs. C12, 121±6, p<0,01). El peso del hígado (g, DG12, 13.3±0.7 vs. C12, 11.1±0.8, p<0.05); el cociente peso del hígado/peso corporal (mg/g, 2.82±0.12 vs. 2.60±0.05, p<0.05); y el cociente espesor de la pared/diámetro de la luz de la aorta abdominal (µm/mm, DG12 63.7±3.7 vs. 46.7±3.4, p<0.01) aumentaron a partir de la semana 12. Se concluye que la DG produce un remodelado vascular que contribuiría a aumentar la resistencia periférica y la PAS; y alteraciones estructurales hepáticas que empeorarían la resistencia a la insulina al prolongarse la modificación dietaria.

076 (291) EFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS TRANS EN LA REGULACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS HEPÁTICOS EN ANIMALES ALIMENTADOS CON DIFERENTE PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS

Jimena V Lavandera[12]; Julieta Jovellano[1]; Agustina Kler[1]; Juliana Sain[12]; Claudio A. Bernal[12]; Marcela A. Gonzalez[1]
Universidad Nacional del Litotal, Fac. de Bioq. y Ccias. Biol., Cátedra de Bromatología y Nutrición[1] Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)[2]

La ingesta de ácidos grasos trans (AGt) y el consumo de distintos tipos de grasa dietaria están directamente relacionados con la modulación de los niveles tisulares y plasmáticos de triglicéridos (TG). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de dietas con diferente perfil de ácidos grasos insaturados (AGI) y la presencia o no de AGt sobre la regulación de TG en ratones. Ratones CF1 macho (22g) fueron alimentados (120 días) con dietas estándar (AIN: American Institute of Nutrition) que difieren en las relaciones de los distintos AGI n-3/n-6/n-9: Aceites de Canola (C)(10,9/19,0/63,2), Maíz (M)(0,9/53,3/31,3) y Oliva (O) (0,8/9,7/76,3); en ausencia ó presencia de 0,75% AGt: Ct, Mt, Ot, respectivamente. Se determinó: contenido de triglicéridos séricos (TGs) y hepáticos (TGh), velocidad de secreción hepática de triglicérido-pre-β-lipoproteínas (VSTG) y capacidad de remoción periférica de los TG circulantes a través de la enzima lipoproteína-lipasa (LPL), en tejido adiposo (TA) y músculo. Resultados: media±SEM p<0,05 (One-Way ANOVA, Scheffé). Los niveles de TGh aumentaron por la adición de AGt en los grupos: O (53%), M (76%) y C (68%), mientras que los TGs sólo fueron aumentados en el grupo Ct (49%). La VSTG aumentó significativamente en los grupos Ot (156%) y Ct (57%), sin cambios en Mt. La actividad de LPL en TA varió en Ot (+80%), mientras que en músculo se vio incrementada por los AGt en los grupos O y M (43% y 32% respectivamente). Los AGt condujeron a una esteatosis hepática en los grupos O, M y C. La VSTG fue incrementada por acción de los AGt en los grupos O y C, con aumento en los TGs solo en el grupo Ct. Este aumento en los TGs en Ct estaría relacionado a la ausencia de cambios en las actividades de LPL. Los niveles normales de TGs encontrados en el grupo Ot vs O, se deberían a un aumento en las actividades de LPL en músculo y tejido adiposo. Los AGt afectaron los TG a través de distintos mecanismos dependiendo de la grasa dietaria utilizada.

077 (341) COMPARACION DEL EFECTO PREBIOTICO ENTRE LA HARINA DE LUPINO Y UN PAN ELABORADO CON HARINA DE TRIGO, EN UN MODELO EXPERIMENTAL EN RATAS

Adriana Weisstaub[1]; María Inés Palacio[2]; Analía Etcheverría[2]; Luis Dyner[1]; Guillermo Manrique[2]; Angela Zuleta[1]
Universidad de Buenos Aires[1] Univ. Nac. del Centro De La Pcia. de Bs. As[2]

El pan blanco constituye un alimento de consumo masivo apto para la introducción de ingredientes naturales tendientes a la obtención de alimentos funcionales. El lupino (Lupinus albus) contiene galactooligosacáridos (GOS) como rafinosa, estaquiosa y verbascosa que no son hidrolizados en el intestino humano llegando intactos al colon donde son fermentados por bifidobacterias y lactobacilos promoviendo su establecimiento y desarrollo. El objetivo de este trabajo fue comparar el efecto prebiótico sobre la microflora intestinal de dieta control(C) según AIN 93, pan blanco elaborado con harina de trigo(Pb) y de harina de lupino(L) para considerar el posterior diseño de un pan adicionado con harina de lupino. Para ello ratas Wistar macho recién destetadas se alimentaron durante 60 días con las dietas ad libitum (8/grupo)

C, Pb y L. Se recogieron heces frescas para realizar recuentos de enterobacterias en agar Mac Conkey y lactobacilos en agar MRS a tiempo inicial, 20, 45 y 60 días removiéndose el ciego para medir peso y pH cecal. El peso cecal (g) de C, Pb y L no presentó diferencias (3,23 ± 0,36 vs 3,59 ± 0.84 vs 4,15 ± 0.91) aunque L tuvo un menor pH (7.42±025vs 7.15±0.29vs5.99± 0.11 p< 0.0001). El número de lactobacilos (UFC g-1) durante los 60 días fue constante en los tres grupos pero L disminuyó significativamente el recuento de enterobacterias (p<0.0001) por consiguiente C y Pb presentaron una menor relación Lactobacilos/Enterobacterias en comparación a L (-0.03±0.66vs1.00±0.96vs6.47±0.50 p<0.0001). La ingesta de harina de lupino ocasionaría un descenso del pH debido a la fermentación de los GOS manteniendo el crecimiento de lactobacilos y disminuyendo el de enterobacterias en comparación al pan blanco. Los resultados obtenidos permitirían considerar a la harina de lupino como un potencial ingrediente prebiótico en el diseño de panificados más saludables en comparación al pan blanco a base de harina de trigo. * Financiado por UBACyT N° 20020130200028BA y PICT N° 200.

078 (410) EVALUACIÓN DEL ESTADO REDOX EN EL CEREBRO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE EXCITOTOXICIDAD MEDIADA POR GLUTAMATO

Ailen G Hvozda Arana; Claudia G Reides; Romina M Lasagni Vitar; Susana F Llesuy; Sandra M Ferreira
Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Cátedra De Química General e Inorgánica. IBIMOL UBA-CONICET

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central. Niveles incrementados de glutamato han sido asociados con desordenes neurológicos como la epilepsia, isquemia cerebral, parkinson y glaucoma. El objetivo fue evaluar las alteraciones que se producen en el estado redox en el cerebro de ratas en un modelo experimental de excitoxicidad mediado por glutamato. Se utilizaron 2 grupos de ratas Wistar (120 g): a un grupo (n=3) se le inyectó 2 mg de glutamato/ kg de peso por via ip a los días 1, 5 y 9 y un grupo control (n=3) que se le inyectó por via ip solución fisiológica en los mismos tiempos. Las determinaciones se realizaron n homogeneizados de cerebro. Se determinaron marcadores de daño a lípidos, los niveles de glutatión, la capacidad antioxidante total, la actividad de superóxido dismutasa (SOD) y los niveles de catalasa (CAT). Los resultados obtenidos indican que el glutamato produce una disminución significativa del 14% de los marcadores de peroxidación lipidica con respecto al control (2744 ± 6 pmol/mg de proteina; p< 0,01). Los niveles de glutatión en el grupo tratado se encuentran disminuidos significativamente en un 34% con respecto al control (2,6 ± 0,3 µmol/ g órgano; p < 0,01). La capacidad antioxidante total se encuentra disminuida significativamente en un 38% en el grupo tratado con respecto al control (8,9 ± 0,4 nmol/ mg de proteina; p < 0,01). No se observaron cambios significativos en la actividad de SOD ni en los niveles de CAT. Estos resultados sugieren que en este modelo experimental se observa una disminución significativa de los niveles de antioxidantes no enzimáticos sin alteraciones en las enzimas antioxidantes evaluadas. El daño a lípidos se encuentra disminuido, lo cual podría sugerir que es a expensas de consumir antioxidantes no enzimáticos. Esta situación puede ser revertida por la utilización de estrategias terapéuticas con sustancias antioxidantes.

079 (496) GLUTAMINA COMO ESTRATEGIA TERAPÉUTICA PARA LA PROTECCIÓN DE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE CALCIO AFECTADA POR ESTRÉS OXIDATIVO

Luciana Beatriz Moine[1]; Gabriela Edith Díaz De Barboza[2]; Adriana. Pérez[2]; Nori Graciela Tolosa De Talamini[12]
Lab Metabolismo Fosfocalcico y Vit D Dr Fernando Cañas. INICSA-CONICET. UNC[1] Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Médicas. UNC[2]

Menadiona (MEN) disminuye la absorción intestinal de $Ca+^2$ a través de estrés oxidativo y apoptosis de enterocitos. Se ha reportado que glutamina (GLN) previene la muerte celular desencadenada por estrés oxidativo. Entonces, es posible suponer que su administración puede prevenir los efectos causados por MEN. Por ello, nos propusimos estudiar el rol protector de GLN sobre la absorción intestinal de $Ca+^2$ alterada por la quinona. Se evaluó el efecto de GLN en pollos Gallus gallus adultos. La absorción intestinal de $Ca+^2$ se midió por la técnica del asa intestinal ligada in situ. Se cuantificó el contenido de glutatión intracelular (GSH) y la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) por espectrofotometría. La apoptosis se evaluó por la técnica de TUNEL, expresión de proteínas pro y antiapoptóticas por western blot y determinación de la actividad de caspasa 3 por ELISA. Los datos se analizaron mediante ANOVA a una vía y test de Bonferroni, considerando diferencias significativas a p<0,05. Los resultados indican que la menor dosis y tiempo de tratamiento para la prevención de la absorción intestinal de $Ca+^2$ fue 0,5g de GLN/kg de peso corporal (pc) por vía oral administrada 30 min antes de 2,5 µmol de MEN/kg de pc por vía intraperitoneal. GLN previno la disminución de GSH y el aumento de la actividad de CAT y SOD provocada por MEN. Evitó el incremento de enterocitos TUNEL positivos, de la actividad de caspasa 3 y de la expresión proteica de la molécula proapoptótica FAS producidos por MEN. Se observó una tendencia a prevenir la disminución de la expresión de calbindina D28k, proteína antiapoptótica. En conclusión, GLN protege a los enterocitos de la apoptosis desencadenada por MEN. Probablemente, este efecto se deba al mantenimiento del estado redox y al bloqueo de la vía apoptótica extrínseca mediada por FAS. GLN protegería la absorción intestinal de $Ca+^2$ por mantenimiento del número de células con capacidad de absorción.

080 (587) ESTUDIO DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN HEPÁTICA DE INSULINA EN RATONES KNOCK-OUT PARA EL RECEPTOR TNFR1 (KOR1) EN UN MODELO DE DIETA RICA EN GRASA (HIGH FAT DIET, HFD)

Flavia Lambertuccci[1]; Ainelen Arboatti[1]; María Guillermina Sedlmeier[1]; Silvina Villar[2]; María Paula Ceballos[1]; Eduardo Roggero[2]; María De Lujan Alvarez[1]; Ariel Quiroga[1]; Cristina Ester Carnovale[1]; Daniel Eleazar Frances[1]; María Teresa Ronco[1]
IFISE[1] IDICER[2]

La obesidad es considerada un proceso inflamatorio con aumento de TNFa, que al interaccionar con el receptor TNFR1, modula la vía de señalización de la insulina a través de la activación de JNK (c-Jun N-terminal quinasa) disminuyendo la amplificación intracelular de la señal. En el presente trabajo nos planteamos evaluar el rol del receptor TNFR1 hepático en la vía de señalización de la insulina en un modelo de dieta rica en grasa. Ratones adultos C57BL/6 wild type (WT) y KOR1 (n=6 c/u) fueron alimentados con dieta estándar (CHOW-WT, CHOW-KOR1) y con dieta rica en grasa (40%) durante 16 semanas (HFD-WT, HFD-KOR1). Glicemia (mg/dl, ayuno 10 h): CHOW-WT:91,8±13,0; CHOW-KOR1:71,7±4,4; HFD-WT:136,6±7,2*; HFD-KOR1:100,6±4,4†# (*p<0,05 vs CHOW-WT; †p<0,05 vs CHOW-KO; #p<0,05 vs HFD-WT). La prueba de tolerancia a la glucosa (2gr/kg p.c.) mostró un aumento significativo en los valores del área bajo la curva en los ratones HFD-WT (+23%), CHOW-KOR1 (+36%), HFD-KOR1 (+42%) vs CHOW-WT (p<0,05). Para evaluar, in vivo, la vía de señalización de insulina a los ratones de los distintos grupos se les administró insulina corriente (0,75U/kg p.c.) 15 minutos antes de la eutanasia. Se determinó por Western Blot la fosforilación (P) del Receptor de Insulina (RI), de la proteínas AKT y JNK, observándose un cambio significativo en los animales HFD-WT (P-RI: -43%, P-AKT:-35%, P-JNK: +30%) con respecto a los CHOW-WT (p<0,05). Además se observó una disminución en P-RI, P-AKT y P-JNK en los animales KO en ambas dietas: CHOW (P-RI: -20%, P-AKT: -35%, P-JNK: -26%) y HFD (P-RI: -31%, P-AKT: -44%, P-JNK: -22%) (p<0,05). Estos resultados fueron corroborados en un modelo in vitro de cultivo primario de hepatocitos de ratones WT y KOR1. Nuestros resultados sugieren que la ausencia del receptor TNFR1 produce una disminución en la activación de la vía de señalización de insulina hepática, tanto en CHOW como HFD, y que la misma no estaría mediada por activación de JNK.

081 (602) INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE MIELOPEROXIDASA EN EL PULMÓN OBESO MEJORA LA SENSIBILIDAD A LA INSULINA

María Cecilia Della Vedova[1]; Marcos David Muoz[1]; Martin Rinaldi Tosi[1]; María Gabriela Plateo-Pignatari[1]; María Jose German[2]; Silvina Garcia[1]; Sandra E. Gómez-Mejiba[1]; Nidia Noemi Gómez[2]; Dario Ceferino Ramirez[1]
IMIBIO-SL[1] Universidad Nacional de San Luis[2]

El efecto y mecanismo de la inflamación sistémica crónica sobre la inflamación pulmonar y como esta afecta la resistencia a la insulina (RI) en sujetos obesos no ha sido elucidado. Previamente hemos reportado que el pulmón de ratones obesos por la dieta contiene más neutrófilos, mieloperoxidasa (MPO) y marcadores de oxidación por HOCl. Por otro lado, la hidrazida del ácido 4-aminobenzoico (ABAH) inhibe la producción de HOCl por MPO (IC50% 0.3 mM). Hipotetizamos que la producción de HOCl por MPO en el pulmón obeso agudiza la RI periférica mediante la liberación de productos oxidados y mediadores de la inflamación, resultantes de la inflamación neutrofílica pulmonar, en la circulación sistémica. Para probar nuestra hipótesis un grupo de ratones B6 fue alimentado ad-libitum por 16 semanas con una dieta rica en grasa y fructosa (HFD+F, obesos) y una dieta baja en grasa (LFD, control). Durante la última semana de dieta los animales fueron intratraquealmente instilados diariamente con: PBS(vehículo), LPS[50mg/ratón], ABAH[0,5nmoles/ratón] y ABAH+LPS. A nivel pulmonar y sistémico, y con respecto al grupo control, los ratones obesos tuvieron mayor: glucemia basal, RI (AUC), neutrófilos, actividad y proteína MPO, marcadores de estrés oxidativo (clorotirosina y nitrotirosina) y TNF-a. El pre-tratamiento con ABAH redujo la actividad de MPO en pulmón y suero, y además normalizó la RI en obesos. Por otro lado, la instilación intratraqueal de LPS a ratones control y obesos incrementó el contenido de neutrófilos, MPO y marcadores de estrés oxidativo e inflamación, e indujo (en control) o agudizó (en obesos) la RI. Estos efectos de LPS en ratones control y obesos fueron prevenidos en ratones control y obesos pre-tratados con ABAH. Estos datos garantizan la búsqueda de inhibidores de MPO para reducir la inflamación pulmonar y sistémica, y por ende reducir la RI en obesos, especialmente aquellos expuestos a contaminantes del aire. PICT-2014-3369/ PROICO-2-3214 (DCR) y PROICO10-0414(SEGM)

082 (639) DOS NUEVOS CASOS DE COEXISTENCIA DE PORFIRIA VARIEGATA Y PORFIRIA CUTANEA TARDIA

Viviana Alicia Melito[12]; Gabriela Nora Cerbino[1]; Nancy Medina[1]; Bárbara Xoana Granata[1]; Marcelo Néstor Guolo[1]; Fabiana Alejandra Caballero[1]; María Victoria Rossetti[1]; Victoria Estela Parera[1]
CIPYP - CONICET - UBA[1] FCEyN - UBA[2]

Las Porfirias son enfermedades raras, hereditarias e independientes entre sí, pero existen casos de coexistencia como Porfiria Cutánea Tardía (PCT) y Porfiria Variegata (PV) en una familia o un individuo. La PCT puede ser Adquirida (PCT-A: 75%) y resulta de una falla genética en la Uroporfirinógeno decarboxilasa (URO-D) o de su inhibición y se manifiesta con lesiones dermatológicas en zonas expuestas. La PV es una Porfiria mixta por actividad reducida de la Protoporfirinógeno oxidasa (PPOX), con sintomatología aguda y/o cutánea. En PV: ác. delta-aminolevúlico (ALA), porfobilinógeno (PBG) y porfirinas (PTO) urinarios elevados en los ataques agudos; porfirinas fecales aumentadas (PTMF) con patrón de excreción e Indice de porfirinas plasmáticas (IPP) característicos. Los pacientes PCT tienen porfirinas urinarias, con predominio de uro y heptaporfirinas e IPP elevados. Se estudiaron 2 pacientes con manifestación cutánea pertenecientes a familias PV. P1: portador latente de la mutación familiar (c.808-1G/C), desencadenó sintomatología cutánea a los 70 años. P2: joven de 30 años presentó síntomas cutáneos luego de tomar anticonceptivos durante 4 años. Se cuantificaron ALA, PBG, PTO, IPP, PTMF y patrones de excreción de PTO y de PTMF. Se amplificaron y secuenciaron los genes que codifican para la PPOX y la URO-D. P1: PTO= 8594 µg/24h, CRO: 45% Uro, 30% Hepta, 5% Hexa, 10% Penta, 10% Copro; IPP= 3,63 (619nm). PTMF: 280 µg/gseco. P2: PTO= 4790µg/24h, CRO: 50% Uro, 35% Hepta, 5% Hexa, 5% Penta, 5% Copro, IPP= 5,32 (619nm). PTMF= 446 µg/gseco. No se detectó la mutación familiar (c.503 G >A, p.R168H). No se detectó mutación en el gen URO-D indicando que en ambos pacientes se trata de PCT-A. Estos casos enfatizan la importancia de establecer el diagnóstico diferencial correcto para aplicar el tratamiento específico, en particular cuando coexisten una Porfiria netamente cutánea (PCT) y otra con compromiso agudo (PV), con abordajes terapeúticos y consejo genético diferentes.

083 (649) LONGITUD TELOMÉRICA EN PACIENTES CON DIABETES TIPO 2 DESCOMPENSADA METABÓLICAMENTE Y LUEGO DEL TRATAMIENTO

Andrea Elena Iglesias Molli[1]; Andrea Millán[1]; Alberto Penas Steinhardt[23]; María Amelia Linari[4]; Gloria Edith Cerrone[1]; Gustavo Daniel Frechtel[1]
INIGEM, Laboratorio de Diabetes y Metabolismo, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA-CONICET.[1] IDEHU, División Endocrinología, Hospital de Clínicas "José de San Martín", UBA-CONICET[2] Instituto Universitario en Ciencias de la Salud, Fundación "H.A.Barceló", Secretaría de Ciencia y Te[3] Sección de Endocrinología y Nutrición, UOM Vicente López[4]

Introducción: La diabetes de tipo 2 (DM2) se caracteriza por presentar un estado de inflamación crónica de bajo grado, que se asoció a una menor longitud telomérica (LT). Objetivos: Estudiar la LT en pacientes con DM2 descompensada y luego del tratamiento; y correlacionarlo con variables bioquímico-clínicas. Metodología: Se estudiaron 30 pacientes con DM2 descompensados metabólicamente (HbA1c>8%), y luego de 6 meses de tratamiento farmacológico y cambios en el estilo de vida (HbA1c<7%). A todos ellos se les tomaron determinaciones bioquímicas, clínicas y antropométricas. La LT se determinó por PCR cuantitativa en tiempo real por método SYBR Green, midiendo por duplicado la relación entre la longitud de los telómeros y el número de copias simples del gen RPLPO (radio T/S) en ADN genómico extraído de sangre periférica por la técnica del CTAB. Los resultados se analizaron estadísticamente en SPSS 20.0 con un nivel de significación de 0,05. Resultados: Las variaciones de la LT luego del tratamiento no mostraron cambios estadísticamente significativos, pero se observó una asociación entre el aumento de la LT y una mayor disminución en los valores de HbA1c (p=0.049, r=0.485). La LT se asoció con la edad (p=0.010, r=-0.588), y se observó una correlación negativa entre la variación en la LT y la edad (p=0.035, r=-0.513). Además se observó una correlación positiva entre la variación de la LT y la dosis de metformina empleada en el tratamiento (p=0.007, r=0.627). Conclusiones: En aumento en la LT se asoció a los pacientes que presentaron un mejor control metabólico, evaluado en función al nivel de disminución de los valores de HbA1c. Además los pacientes de edades avanzadas mostraron mayor acortamiento de la LT comparado a aquellos más jóvenes. Hace falta definir el efecto farmacéutico de la metformina sobre el LT.

084 (669) EFECTOS DE LA MALNUTRICIÓN PROTEICA DURANTE EL DESARROLLO SOBRE LA FISIOLOGÍA HEPÁTICA DE RATAS ADULTAS

Rocío Abalo[1]; Stella Maris Echarte[2]; Estela Motta3; Eduardo Horacek[3]; Sabrina Campisano[1]; Andrea Chisari[2]
Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNMdP[1] Instituto de Investigaciones Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNMdP[2] Servicio de Laboratorio Central; Hospital Dr Oscar Alende, Mar del Plata[3]

Estudios recientes demostraron que las consecuencias de una nutrición inadecuada en el útero pueden extenderse a la etapa adulta del organismo afectado. Estas observaciones llevaron a la formulación de una hipótesis conocida globalmente bajo el nombre de "fetal programming" (programación fetal); la misma se basa en la relación entre un bajo peso al nacer, generalmente ocasionado por una dieta restrictiva en las madres gestantes, y

la susceptibilidad a padecer diferentes patologías en la etapa adulta. El objetivo es estudiar los efectos de una malnutrición proteica durante la gestación-lactancia, al destete y hasta los 120 días de edad sobre la función hepática de los descendientes. Se emplearon ratas Wistar preñadas alimentadas con una dieta con 8% de proteínas durante la gestación-lactancia. Al día 120 post-nacimiento los animales fueron sacrificados, se les extrajo sangre por punción cardiaca y se disecó el hígado. Se registró el peso corporal y del hígado. Se evaluó los niveles séricos de las transaminasas (GOT y GPT), proteínas totales (Pt), triglicéridos (TG), colesterol (Col) y glucemia (Glu). La estructura hepática se analizó en cortes histológicos. Los pesos corporales y hepáticos resultaron significativamente ($p<0,05$) menores en los individuos del grupo MM respecto a los CC y MC. Los niveles séricos de Pt y Col no mostraron diferencias significativas; mientras Glu y TG resultaron mayores en MC respecto de los CC y MM (diferencias significativas $p<0,05$). La curva de Tolerancia a la glucosa mostró tener un área inferior significativamente en MM ($p<0.05$). Los preparados histológicos presentaron diferencias notorias: los MM poseen gran cantidad de vacuolas lipídicas. En Conclusión: La falta de proteínas durante el desarrollo, compromete la integridad a nivel estructural y funcional del hígado, que se manifiestan en la adultez.

CARDIOVASCULAR 1

085 (44) EL CARVEDILOL Y SUS ANÁLOGOS PREVIENEN LAS ARRITMIAS INDUCIDAS POR DIGITÁLICOS

Luis Alberto Gonano[1]; Tamara Tottef[1]; Marisa Sepúlveda[1]; Alicia Mattiazzi[1]; Wayne Chen[2]; Martín Vila Petroff[1]
Centro de investigaciones cardiovasculares. UNLP-CONICET[1] Universidad de Calgary[2]

El efecto inotrópico producido por la inhibición de la Na+/K+-ATPasa con digitálicos ha sido usado para tratar la insuficiencia cardíaca por más de 200 años. Sin embargo, la ventana terapéutica de estos fármacos se ve limitada por la aparición de arritmias. Recientemente demostramos que estas arritmias son mediadas por la fosforilación del receptor de ryanodina (RYR2), que promueve la pérdida espontánea de Ca^2+ del retículo sarcoplasmático (RS). Teniendo en cuenta estudios que muestran que el Carvedilol y sus análogos son capaces de prevenir las arritmias inducidas por sobrecarga de Ca^2+ del RS, hipotetizamos que al reducir la probabilidad de apertura del RYR podrían prevenir las arritmias inducidas por digitálicos. En cardiomiocitos de rata estimulados a 0.5 Hz y tratados con ouabaina, observamos un aumento del 60 ± 5% (n=15) en la amplitud de contracción y la aparición de contracciones espontáneas (CE) al retirar la estimulación eléctrica. El tratamiento con Ouabaina 50 µM aumentó el número de CE de 11 ± 4/10 min (en ausencia de Ouabaina) a 69 ± 10/10min (n=13). Al realizar experimentos similares en presencia de 1 µM Carvedilol, la frecuencia de CE se redujo significativamente (24 ± 4/10min; n=13. $P<0.05$). Para confirmar que la capacidad del Carvedilol para prevenir la actividad espontánea inducida por ouabaina se debe a su capacidad de estabilizar el RYR y no a su efecto β bloqueante, repetimos experimentos; 1) en presencia de un bloqueante β distinto, el Atenolol y 2) en presencia de un análogo del Carvedilol con mínima actividad β bloqueante (VK-II-86). Observamos que 1 µM Atenolol no fue capaz de prevenir las CE inducidas por Ouabaina (65 ± 20 eventos/10min; n=7) en tanto que VK-II-86 redujo significativamente la frecuencia de CE inducidas por Ouabaina (39 ± 9 eventos/10min; n=14. $P<0.05$). Concluimos que el tratamiento combinado de digitálicos con análogos del Carvedilol podría ampliar la ventana terapéutica de los primeros, al reducir el riesgo de arritmias.

086 (50) EL BLOQUEO CRÓNICO DEL RECEPTOR DE ENDOTELINAS A (ET-A) REGULA LA PRESIÓN ARTERIAL (PA) Y LA TIROSINA HIDROXILASA (TH) EN BULBO OLFATORIO (BO) DE RATAS HIPERTENSAS DOCA-SAL

Luis Roberto Cassinotti[1]; María Julia Guil[1]; Vanina Paola Morales[1]; Liliana Bianciotti[2]; Marcelo Sergio Vatta[1]
Cátedra de Fisiología, IQUIMEFA-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires[1] Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. INIGEM-CONICET[2]

Numerosos estudios demostraron la participación del sistema nervioso central (SNC) en la regulación de la PA y en el desarrollo y/o mantenimiento de la hipertensión. El SNC juega un papel clave en la regulación a corto plazo de la PA y nuevas investigaciones avalan su participación a largo plazo. Poco se conoce acerca del papel del BO en el control de la actividad cardiovascular. Resultados de nuestro laboratorio demostraron que la transmisión noradrenérgica se encuentra aumentada en el BO de ratas hipertensas DOCA-sal. El tratamiento agudo con el antagonista del receptor ET-A (BQ-610), administrado vía intracerebroventricular (ICV), disminuyó la transmisión noradrenérgica lo que se vio acompañado por una disminución de la PA en estos animales. Como existen diferencias entre la regulación aguda y crónica de la PA, el objetivo del presente trabajo es estudiar los efectos crónicos de la infusión ICV de BQ-610 (100ng/ul, flujo de 12ng/h) en los animales DOCA-sal. Durante cinco semanas se evaluó la PA y la frecuencia cardíaca. Los dos grupos experimentales, normotenso y DOCA-sal, fueron subdivididos a la cuarta semana en dos subgrupos; uno recibió líquido cefalorraquídeo artificial y el otro BQ-610 durante 7 días. Finalizada la semana 5 los animales se sacrificaron y se aisló el BO para la evaluación de los niveles totales de la TH y sus variantes fosforiladas en las serinas 19, 31 y 40 como marcadores de la actividad de la enzima. Los resultados mostraron que el BQ-610, administrado crónicamente, en las ratas DOCA-sal disminuyó la PA en 20mmHg. Además, en BO los niveles totales de la TH y de todas las variantes fosforiladas disminuyeron en los animales hipertensos tratados. Estos resultados muestran que el bloqueo crónico central del receptor ET-A disminuye la PA en los animales DOCA-sal y produce la disminución de la transmisión noradrenérgica en el BO lo que sugiere una relación entre el esta región del SNC y la regulación central de la función cardiovascular.

087 (51) EL TRATAMIENTO CON UN EXTRACTO DE CACAO ENRIQUECIDO EN POLIFENOLES DISMINUYE EL TAMAÑO DEL INFARTO Y MEJORA EL ESTADO MITOCONDRIAL EN RATAS NORMOTENSAS E HIPERTENSAS ESPONTÁNEAS (SHR)

Luisa Fernanda Gonzalez Arbelaez[13]; Juliana C Fantinelli[13]; Alejandro Ciocci Pardo[13]; José Luis Ríos[2]; Guillermo Schinella[3]; Susana M Mosca[13]
Centro de Investigaciones Cardiovasculares[1] Universitat de Valencia, España[2] Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata[3]

Alimentos derivados del cacao, Theobroma cacao L. (Sterculiaceae), tales como chocolate yproductos relacionados, son alimentos ricos en polifenoles que resultan del procesamiento industrial del grano. Nuestro objetivo fue determinar los efectos de un extracto de cacao enriquecido en polifenoles (EC) en isquemia-reperfusión miocárdica. Los principales componentes del EC utilizado son: epicatequina, procianidina B2, catequina y procianidina B1. Corazones aislados de ratas normotensas (Wistar, W) e hipertensas espontáneas (SHR) fueron sometidos a 30 min de isquemia global y 60 min de reperfusión según la técnica de Langendorff. En el grupo tratado, EC (30 µg/ml) fue administrado durante los 10 primeros minutos de la reperfusión. Se midió el tamaño del infarto y la expresión de las formas fosforiladas de Akt, GSK-3β y eNOS. El estado mitocondrial fue evaluado a través de la medición de la respuesta al calcio del poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria (PPTM) por cambios de la dispersión de la luz (DL) y el potencial mitocondrial (Dym) en mitocondrias aisladas. EC disminuyó significativamente el tamaño del infarto (9 ± 1 y 12.4 ± 0.6% vs. 29 ± 2 y 31 ± 2% para W y SHR, respectivamente), y aumentó la expresión de P-Akt, P-GSK-3β y P-eNOS. La respuesta del PPTM al calcio aumentó significativamente en mitocondrias de ratas tratadas con respecto a las controles (0.60 ± 0.02 vs. 0.15 ± 0.04 u.a. en

W; 0.54 ± 0.03 vs. 0.10 ± 0.02 u.a. en SHR). El Dym fue más electronegativo en los animales tratados (-134 ± 11 vs. -110 ± 4 mV para W control; -122 ± 8 vs.-110 ± 9 mV en SHR control). Estos datos demuestran que EC disminuye el tamaño del infarto siendo mayor en las ratas normotensas. Este efecto aparece asociado a una mejora del estado mitocondrial traducido en una mayor respuesta al calcio y una menor despolarización. Estas acciones beneficiosas serían mediadas a través de la activación de vías dependientes de Akt, GSK-3β y eNOS.

088 (70) EFECTOS DEL COMPUESTO C (CC), INHIBIDOR DE LA KINASA ACTIVADA POR AMP (AMPK) EN AURÍCULAS AISLADAS DE RATAS SOMETIDAS A ISQUEMIA-REPERFUSIÓN SIMULADAS (IS-RS) EN PRESENCIA DE ÁCIDOS GRASOS (AG) EN EL MEDIO DE INCUBACIÓN

Hermann, Romina; Fernandez Pazos, María De Las Mercedes; Mestre Cordero, Victoria; Reznik, Federico; Velez, Debora; Savino, Enrique; Marina Prendes, María Gabriela; Varela, Alicia
Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. IQUIMEFA-CONICET

El papel desempeñado por la AMPK, en la injuria por isquemia-reperfusión es controversial. Está bien demostrado que esta enzima se activa en la isquemia, activación que persiste en la reperfusión, estimulando la glucólisis y la oxidación de los AG. Además, se ha hallado que los niveles plasmáticos de AG se elevan junto con la aparición de los síntomas asociados con el infarto agudo de miocardio y, en modelos experimentales de isquemia-reperfusión, los AG en concentraciones similares a las halladas en la clínica, disminuyen la recuperación funcional. El objetivo fue estudiar los efectos del CC (10 µM), administrado durante la Is-Rs, en la aurícula izquierda sometida a 75min Is-75min Rs en presencia de AG, analizando la recuperación contráctil y la viabilidad celular. Aurículas izquierdas de ratas hembras estimuladas a 1Hz fueron incubadas isométricamente en Krebs-Ringer (glucosa 10 mM, O_2 95%-CO_2 5%, pH 7,4) o en dicho medio conteniendo palmitato-albúmina 1,2 mEq/L. En la Is se reemplazó O_2 por N_2, glucosa por 2-desoxiglucosa 10 mM, se sustrajeron los AG, pH 6,8. Se empleó ANOVA, n=8. La presencia de AG en el medio de incubación disminuyó la recuperación contráctil y el CC careció de efectos en todos los grupos. (Fuerza sistólica pico (Fs%): Is-Rs 39±3; Is-Rs+CC 42±3; Is-Rs+AG 27±2*; Is-Rs+AG+CC 26±3*; *p<0,05 vs Is-Rs, Is-Rs+CC). Con el fin de aumentar la exigencia energética, se evaluó la máxima respuesta inotrópica al Isoproterenol 2 µM (ISO) añadido al final de la Rs. Tanto los AG como el CC disminuyeron la reserva contráctil. Sin embargo, la disminución en presencia de AG fue revertida por el CC (Fs%: Is-Rs 91±9; Is-Rs+CC 67±7*; Is-Rs+AG 66±8*; Is-Rs+AG+CC 92±5;*p<0,05 vs Is-Rs, Is-Rs+AG+CC). Ni los AG, ni el CC afectaron la viabilidad celular (técnica MTT) (%: Is-Rs 72±9; Is-Rs+CC 64±9; Is-Rs+AG 64±6; Is-Rs+AG+CC 76±4). Los resultados sugieren que la AMPK resultaría nociva o beneficiosa dependiendo de los sustratos energéticos presentes en la reperfusión.

089 (104) EFECTO DEL TRATAMIENTO DE PROANTOCIANIDINAS EXTRAÍDAS DE LIGARIA CUNEIFOLIA (LC) EN RATAS WISTAR CON DIETA HIPERLIPÉMICA SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE COLESTEROL PLASMÁTICO Y LA VISCOSIDAD SANGUÍNEA

Gloria García[1]; Diego Crosetti[1]; Alicia Dominighini[1]; Sebastian Galliano[1]; Natasha Gerschcovsky[1]; Jose Gonzalvez[1]; Leda Urli[1]; Juan Monti[2]; María Teresa Ronco[2]; Marcelo Wagner[3]; Cristina Carnovale[2]; Alejandra Luquita[1]
Biofísica - FCM - UNR[1] Fisiología - Fac. Cs. Bioq. y Farm. - UNR-CONICET[2] Farmacobotánica - Fac. Farm. y Bioq. - UBA[3]

Lc o "muérdago criollo" es utilizada como infusión en medicina popular para dar mayor fluidez a la sangre disminuyendo el exceso de colesterol plasmático. Anteriormente demostramos que en ratas tratadas con extracto crudo de Lc vía intraperitoneal (i.p.), disminuye el colesterol (Co) plasmático y aumenta la viscosidad sanguínea. Del extracto crudo se purificó Proantocianidina (PLc). Analizamos el efecto del tratamiento de PLc sobre la concentración plasmática de Co y la viscosidad sanguínea. Ratas Wistar macho adultas endocriadas (n=24), de 70 días de edad, tratadas de acuerdo a normas internacionales, fueron alimentadas durante 28 días con dieta estándar adicionada con 40% de primer jugo bovino (cada 100g: 1,2g de Co, 1,06g de grasa total y 6,8g de proteínas). Se utilizaron ratas Controles (C) (n=12) inyectadas i.p. con solución fisiológica y Tratadas (T) (n=12) inyectadas i.p. con PLc 3mg/100g peso corporal, cada 24 horas durante 3 días. Al cuarto día las ratas se anestesiaron con Ketamina-Xilacina (100mg/kg-3mg/kg i.p.), obteniéndose sangre por punción cardíaca. Se determinaron en plasma: Co, CoHDL, CoLDL y Triglicéridos (TG) por métodos enzimáticos. En sangre: viscosidad sanguínea y plasmática con viscosímetro rotacional Wells-Brookfield LVT a una velocidad de cizallamiento de 230 s-1 a 37 ºC. La viscosidad sanguínea relativa estandarizada a un hematocrito de 45%(VSrs), se calculó como: (Viscosidad sanguínea/Viscosidad plasmática) 45/Hto. Resultados(media ± ES): Co plasmático (mg%): C:97,50±4,69, T:53,47±4,14**; CoHDL: C:25,00±0,87, T:24,00±0,79 (ns vs. C); CoLDL: C:24,12±1,20, T:19,03±0,33**; TG: C:164,62± 29,55, T:83,30±6,63**; VSrs: C:6,39±0,32,T:5,85±0,08* (*p<0,05; **p<0,001). El tratamiento con PLc produce un descenso de Co plasmático, CoLDL y TG, que conduce a disminución de la viscosidad sanguínea en ratas hiperlipémicas. Es importante haber logrado una fracción de Lc que es un potente hipolipemiante.

090 (197) PAPEL DEL OXIDO NITRICO SOBRE EL EFECTO INOTROPICO NEGATIVO ASOCIADO CON EL ESTRÉS HIPEROSMÓTICO

Malena Morell; Luis Gonano; Juan Ignacio Burgos; Martin G Vila Petroff
Centro de Investigaciones Cardiovasculares Dr Horacio E Cingolani

En diferentes situaciones patológicas como estados de deshidratación severa, hiperglucemia, hiperlipidemia y diabetes, los cardiomiocitos sufren encogimiento osmótico y éste se asocia con un efecto inotrópico negativo (EIN). En un trabajo previo demostramos que el hinchamiento hipotónico promueve la liberación de Óxido Nítrico (NO) y que éste aportaría soporte contráctil. El objetivo de este estudio es evaluar si el estrés hiperosmótico (SH) también promueve la liberación de NO y de ser así, examinar su impacto sobre la contractilidad.La perfusión de miocitos cardíacos de ratas wistar macho, cargados con el sensor de NO (DAF-FM), con una solución hipertónica (SH:440 mOsm) provoca la disminución del volumen celular (26%±1.95; n=21) y el aumento de la fluorescencia de DAF-FM (10%±2.55; n=22) comparado con miocitos perfundidos con solución isosmótica (SI:309 mOsm;n=10). Cuando se exponen las células a la SH suplementada con L-NAME (inhibidor de las Óxido Nítrico Sintasas (NOS)), con Nitroguanidina (NG:inhibidor de la NOS1) y con Wortmanina (WT:inhibidor de la NOS3) éstas sufren la reducción en su volumen pero con ausencia de liberación de NO. Cuando se cargan las células con el indicador de Ca^2+i FURA 2 AM se observa que el transitorio de Ca^2+ no se modifica durante el estrés hiperosmótico, pero se detecta una marcada reducción en la amplitud de contracción (67.9%±5.6; n=10) sugiriendo que el SH produce un EIN debido a una disminución en la sensibilidad de las proteínas contráctiles al Ca^2+. El EIN observado durante el SH se exacerba en presencia de L-NAME y de WT (88.06%±4.5;n=11 y 89.36%±5.84;n=5 respectivamente) pero no se modifica con NG, sugiriendo que el NO derivado de la NOS3 estaría generando el soporte contráctil. Estos resultados sugieren que durante el estrés hiperosmótico se libera NO vía NOS1 y NOS3. La isoforma NOS3 sería la encargada de jugar un papel protector al reducir el EIN asociado con el estrés hiperosmótico.

091 (203) IGF-1 COMO POTENCIAL MEDIADOR DE LA CARDIOPROTECCIÓN INDUCIDA POR EL ENTRENAMIENTO

AERÓBICO EN RATAS SHR: ROL DEL NHE-1 Y DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO

Alejandra Del Milagro Yeves; Andres Javier Medina; Irene Lucia Ennis
Centro de Investigaciones Cardiovasculares. Fac. Cs . Médicas. UNLP-CONICET

El miocardio de las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) presenta alteraciones estructurales y funcionales características de la hipertrofia cardiaca patológica, entre las que se destacan el aumento del estrés oxidativo, la hiperactividad del intercambiador Na+/H+ cardiaco (NHE-1) y la activación de calcineurina, fosfatasa rio abajo del NHE-1. Recientemente, demostramos que una rutina diaria de natación es capaz de convertir el remodelado cardíaco patológico de las ratas SHR en fisiológico, proceso acompañado de una disminución de la actividad de calcineurina. En el proyecto actual nuestro objetivo fue evaluar si uno de los efectores del ejercicio aeróbico, el factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1) inhibe la hiperactividad del NHE-1 y el estrés oxidativo en ratas SHR. La actividad del NHE-1 y la producción de H_2O_2 se determinaron por epifluorescencia en cardiomiocitos aislados cargados con los indicadores BCECF-AM y DCF-DA, respectivamente. IGF-1 (10nmol/L) indujo una disminución significativa de la actividad del NHE-1, expresada como eflujo de H+ durante la recuperación de una acidosis intracelular [JH+, en mmol/L/min vs pHi; IGF-1 (n=7) vs control (n=17), $p<0.05$], efecto que se previno en presencia del antagonista especifico del receptor de IGF-1, AG1024 (100 nmol/L, n=6; NS vs control). Además, el IGF-1 disminuyó significativamente el contenido de H_2O_2 intracelular, expresado como% a los 10 min respecto al tiempo cero (IGF-1:-395±275, n=7 vs control: 206±45, n=9), resultado evitado por AG1024 (542±149%, n=3; NS vs. control). El efecto antioxidante de IGF-1 se correlacionó con un aumento de la actividad de la superóxido dismutasa, (en U/mg: IGF-1: 20±1.5, n=7 vs control: 14.5±1.6, n=5, $p<0.05$). En resumen, nuestros resultados sugieren que la inhibición de la hiperactividad del NHE-1 y el efecto antioxidante del IGF-1 constituirían adaptaciones responsables del fenotipo cardiaco fisiológico de las ratas SHR sometidas a una rutina de natación.

092 (228) EFECTO INOTRÓPICO DEL IGF-1 EN CARDIOMIOCITOS AISLADOS DE RATÓN: ROL DEL ÓXIDO NÍTRICO (NO) Y DE LA QUINASA II DEPENDIENTE DE CA^{2+}/CALMODULINA (CAMKII)

Juan Ignacio Burgos; Alejandra Yeves; Irene Ennis; Martín Vila-Petroff
Centro de Investigaciones Cardiovasculares Dr Horacio E. Cingolani, Facultad de Cs. Médicas, UNLP, CCT Conicet La Plata

Las enfermedades cardiovasculares representan la principal causa de muerte en el mundo y su prevalencia está en aumento. El entrenamiento físico aeróbico es una estrategia terapéutica propuesta para reducir la morbimortalidad cardiovascular. Entre los efectos cardíacos beneficiosos inducidos por el ejercicio se destaca un aumento de la contractilidad cardíaca. El principal mediador de la vía de señalización disparada por el entrenamiento es el factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (IGF-1). Sin embargo, aún no se ha dilucidado si el IGF-1 ejerce un efecto directo sobre la contractilidad y en tal caso, el mecanismo intracelular involucrado. En este sentido, ha sido propuesto que la CaMKII desempeña un papel crítico en la adaptación cardíaca contráctil al ejercicio. El objetivo de nuestro trabajo fue explorar el efecto inotrópico del IGF-1 y las vías de señalización intracelular involucradas en cardiomiocitos aislados de ratón. IGF-1 (10 nM) indujo un aumento significativo del acortamiento celular (127,59±7,44%, n=9, vs. basal; $p<0.05$) que se previno por inhibición de la CaMKII con KN93 (2,5 µM, 102,67±2,54%, n=9) y de la síntesis de NO, potencial activador de esta quinasa [L-NAME, 2,5 mM: 79,57±3,39%, n=7; y nitroguanidina (NG), 240 nM: 81,34±6,15%, n=6]. Luego evaluamos la producción de NO, y tal como esperábamos detectamos un aumento significativo en presencia de IGF-1 (142,56±4,24%, n=17), inhibido por L-NAME o NG (110,37±2,52%, n=11 y 114,98±1,33%, n=10, respectivamente), indicando un efecto estimulante de IGF-1 sobre la isoforma neuronal de la NOS (nNOS). La producción de NO inducida por IGF-1 no se redujo por KN93 (135,37±1,10%, n=9), sugiriendo que la activación de CaMKII sería un eslabón posterior en la cadena de señalización. En resumen, el IGF-1 tendría un efecto inotrópico positivo en los cardiomiocitos murinos mediado por la CaMKII cuya activación sería consecuencia del aumento de NO mediada por la nNOS.

093 (305) DESARROLLO DE HIPERTROFIA CARDÍACA INDUCIDA POR LA INHIBICIÓN ESPECÍFICA DEL COTRANSPORTADOR NA+/HCO3- ELECTROGÉNICO CARDÍACO

Romina A Di Mattía; María C Ciancio; Ernesto A Aiello; Alejandro Orlowski
Centro de Investigaciones Cardiovasculares Dr Horacio E. Cingolani

El cotransportador $Na+/HCO_3^-$ cardíaco (NBC) es uno de los principales mecanismos alcalinizantes en los miocitos cardíacos. En el corazón se describieron dos isoformas del NBC; una electrogénica, NBCe1 (2 HCO_3^-:1 Na^+) y otra electroneutra, NBCn1 (1 HCO_3^-:1 Na^+). Aunque en cada ciclo ambas isoformas incorporan Na^+ al interior celular, el NBCe1 lo hace de un modo más eficiente ya que contribuye con la mitad del Na^+ por cada HCO_3^-. El incremento del Na^+ aumenta el Ca^{2+} intracelular conduciendo a la hipertrofia cardíaca (HC). Hemos demostrado una disminución de la actividad del NBCe1 y un incremento del NBCn1 en modelos de HC. Debido a la inexistencia de inhibidores farmacológicos específicos no se ha determinado aún la relación causa/consecuencia. Se desarrolló un ARN de interferencia (shNBCe1) en un vector lentiviral para estudiar el efecto de la inhibición del NBCe1 en la HC. Mediante western-blots se demostró la disminución de la expresión del NBCe1 en células transducidas (cont: 100±5, n=4 vs shNBCe1: 15±2, n=4, $P<0.05$). Con la técnica de inmunofluorescencia se determinó en cultivos de miocitos neonatales transducidos con el shNBCe1 una disminución significativa de la expresión del NBCe1. Además, se obtuvo aumento significativo del tamaño celular (cont: 14330±350, n=68 vs shNBCe1: 18570,61±611*, n=66, $P<0.05$). El lentivirus se inyectó en la pared antero-lateral del ventrículo izquierdo de rata. Luego de 30 días, se obtuvo mediante ecocardiografía el índice de masa ventricular izquierda, evidenciando un incremento en las ratas inyectadas con el shNBCe1 (shNBCe1:1.85±0.07, n=2 vs cont: 1.57±0.03, n=2). Se aislaron los miocitos y se cargaron con el indicador de pH BCECF. Las células se despolarizaron con alto K+ para estudiar la actividad del NBCe1. Las células transducidas con el shNBCe1 mostraron una disminución de la actividad del NBCe1. Estos resultados indican una posible causa del desarrollo de hipertrofia cardíaca por una disminución de la actividad del NBCe1.

094 (489) IMPACTO DE LOS TRASTORNOS TIROIDEOS SOBRE LA FUNCIÓN CARDIOVASCULAR EN LA ADULTEZ. IMPLICANCIA DEL ÓXIDO NÍTRICO CARDÍACO

Natalia Soledad Ogonowski; Débora Pessah; Giselle Piro; Gustavo Cernadas; Noelia Arreche; Bernardita Puchulu; Ana Balaszczuk; Andrea Fellet
Facultad De Farmacia Y Bioquímica UBA

El objetivo fue estudiar la implicancia del óxido nítrico (NO) en los efectos cardiovasculares de las hormonas tiroideas (HT) durante el envejecimiento. Métodos: se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley de 2 (jóvenes, j) y 18 (adultas, a) meses de edad eutiroideas (EU), hipotiroideas (hipo, metimazol 0.02% en el agua de bebida durante 28 días) e hipertiroideas (Hiper, T3 60ug/kg animal i.p cada 2 días durante 28 días),(n=9/grupo). Se determinaron: presión arterial (PA) y frecuencia cardíaca (FC) (método directo), parámetros ecocardiográficos (modo M) y actividad de la NO sintasa (método de conversión de [14C (U)]-L-arginina en [14C (U)]-L-citrulina en aurícula derecha (AD) y ventrículo izquierdo (VI). El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS

Statistics 19.0 (IBM). Los datos se expresaron como la media (X) ± error estándar de la media (ESM). Se consideró significativo el 5% de probabilidad (*p<0.05 versus j del mismo estado tiroideo; †p<0.05 versus EU del mismo grupo etáreo). Resultados:

	EU j	EU a	hipo j	hipo a	Hiper j	Hiper a
FC (lpm)	347±4	373±20	211±3†	184±17†	423±5†	359±15
PAM (mmHg)	91±3	65±2*	74±2†	50±2*†	78±1†	69±3*
Dd (mm)	5.20±0.18	9.97±0.15*	5.23±0.19	6.65±0.09*†	4.70±0.10	6.50±0.10*†
Ds (mm)	1.77±0.06	6.70±0.08*	2.17±0.10	3.65±0.36*†	2.28±0.07	3.60±0.15*†
Actividad NOS AD (pmol, 103/g.h)	16 16861±13	4420±20*	288±10†	1235±9*†	1282±20†	1581±10*†
Actividad NOS VI (pmol, 103/g.h)	146±3	1565±20*	2571±15†	4324±10*†	2345±18†	2496±20†

Conclusiones: El envejecimiento disminuye la función cardiovascular a expensas de una disminución de la fracción de eyecció la cual se acompaña de un aumento del diámetro ventricular. La participación del NO en estas alteraciones depende del estado tiroideo, de la edad y de la cámara cardíaca estudiada.

095 (529) CARDIOTOXICIDAD DE DOXORRUBICINA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE SÍNDROME METABÓLICO INDUCIDO POR UNA DIETA RICA EN FRUCTOSA

Natalia Lucia Rukavina Mikusic[1]; Natalia Ogonowski[2]; Nicolás Martín Kouyoumdzian[1]; Andrea Fellet[2]; María Inés Rosón[1]; Marcelo Choi[1]; Ana Balaszczuk[2]; Stella Maris Celuch[2]
ININCA[1] Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires[2]

La doxorrubicina (DOX) es efectiva en el tratamiento de varios tipos de cáncer, pero la marcada toxicidad cardíaca es un factor limitante para su uso. En este trabajo se investigó la hipótesis de que la cardiotoxicidad de la DOX podría estar aumentada en condiciones patológicas que impliquen un aumento del riesgo cardiovascular.Con este propósito se analizaron posibles alteraciones anatómicas y funcionales cardíacas luego de la administración de DOX en un modelo de síndrome metabólico en ratas. Ratas Sprague-Dawley macho 50-200g) recibieron, durante 8 semanas, fructosa 10% en el agua de bebida (FRU) o agua corriente (controles). Al final de este período se determinó la presión arterial sistólica (PAS) y posteriormente cada grupo fue dividido en dos subgrupos: uno recibió DOX (6 mg/kg, ip) y el otro fue tratado con el vehículo (SF). A los 3 días de la administración se realizó un ecocardiograma doppler y, previo al sacrificio, se extrajo sangre por punción cardíaca para la determinación de parámetros bioquímicos. Los valores de PAS y de triglicéridos plasmáticos (TG) fueron mayores en el grupo FRU que en el control (PAS: control 140+5.7 mmHg vs FRU 163+5.6 mmHg; TG: control 100.4+29.4 vs 230.2+23.9 mg/dl; p<0.05). DOX aumentó casi un 100% (p<0.05) el colesterol total y el LDL plasmáticos, tanto en los animales controles como en los que recibieron una dieta rica en FRU (n=8). La dieta rica en FRU no alteró la relación peso corazón/peso corporal ni produjo cambios en la función sistólica. DOX no modificó la función sistólica en el grupo control, pero indujo disminuciones significativas en el grupo FRU (n=6) (fracción de acortamiento: 0.35+0.03 vs 0.22+0.03, p<0.05; fracción de eyección: 0.66+0.03 vs 0.51+0.05, p<0.05). Se concluye que la cardiotoxicidad producida por DOX podría agravarse en situaciones de mayor riesgo cardiovascular como ocurre en el síndrome metabólico.

096 (632) EFECTOS DEL EJERCICIO MODERADO EN LA HIPERTROFIA MIOCÁRDICA INDUCIDA POR SOBREEXPRE- SIÓN CARDÍACA DE RECEPTORES AT1

Aruanno, María E.; Cassaglia, Pablo; Wilensky, Luciana; Martinez Naya, Nadia L.; MorgunovskyMichell, Isaac L.; Volberg, Veronica; Morales, Celina; Gonzalez, German E.; Gelpi, Ricardo J.
Instituto de Fisiopatología Cardiovascular (Infica), Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Fue mostrado que el ejercicio moderado (EM) transformó la hipertrofia cardíaca patológica en fisiológica en ratas hipertensas. Nuestro objetivo fue evaluar el rol del EM sobre la hipertrofia cardíaca patológica de ratones con sobreexpresión cardíaca específica de receptores AT1 de Angiotensina II (AT1). Métodos: Ratones FBV y transgénicos AT1 fueron divididos en 4 grupos: 1) FBV sedentario (Sed); 2) AT1 Sed; 3) FVB + EM y 4) AT1 + EM. El EM consistió en un protocolo de natación realizada durante 90 minutos por día, 6 días por semana. A las 4 semanas se realizó ecocardiografía y se cuantificó la hipertrofia y la fibrosis cardíaca. Resultados: (Media ± ESM)

	FVB Sed (11)	AT1 Sed (9)	FVB + EM (7)	AT1 + EM (11)
PC (g)	33 ± 1	34 ± 1	31 ± 1	31 ± 1
FC (lat/min)	447 ± 18	293 ± 12†	458 ± 15	276 ± 12‡
VI/LT(mg/mm)	5.0 ± 0.1	6 ± 0.2	6 ± 0.1	7 ± 0.1#
DSVI (mm)	2 ± 0.1	3 ± 0.1	3 ± 0.1	3 ± 0.1
DDVI (mm)	4 ± 0.1	4 ± 0.1	4 ± 0.1	5 ± 0.1‡#
FE (%)	71 ± 1.4	71 ± 1.1	69 ± 1.5	69 ± 1.9
TRIV	19 ± 0.8	24 ± 1.2†	16 ± 0.5	22 ± 1.1‡

PC: peso corporal; VI: ventrículo izquierdo; LT; longitud de tibia; FC: frecuencia cardíaca; DSVI y DDVI: diámetro sistólico y diastólico del VI respectivamente; FE: fracción de eyección; TRIV: tiempo de relajación isovolumétrica* p<0.05 FVB+EM vs FVB Sed;‡ p<0.05 AT1+EM vs FVB EM;† p< 0.05 AT1 Sed vs FVB Sed;#p< 0.05 AT1Sed vs AT1+EM.

Conclusión: El EM incrementó la hipertrofia miocárdica, indujo dilatación ventricular y enlenteció la relajación isovolumétrica, favoreciendo el remodelamiento adverso en ratones con sobreexpresión cardíaca de receptores AT1.

098 (642) EL POSCONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO PROTEGE CONTRA LAS ARRITMIAS DE REPERFUSIÓN EN RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA ALTA EN GRASA Y FRUCTOSA

Emiliano Diez[12]; Natalia Jorgelina Prado[1]; Amira Zulma Ponce Zumino[12]; Roberto Miguel Miatello[12]
IMBECU[1] FCM-UNCuyo[2]

El poscondicionamiento isquémico es una maniobra cardioprotectora con propiedades antiarrítmica, pero se desconoce si sus efectos beneficiosos se mantienen en corazones expuestos a factores de riesgo coronario, como aquellos presentes el síndrome metabólico asociado al consumo de dietas ricas en grasas y carbohidratos. Nos propusimos evaluar si el poscondicionamiento mantiene sus propiedades antiarrítmicas en animales alimentados con una dieta alta en grasa y fructosa, un modelo en el que recientemente confirmamos un aumento de la incidencia de arritmias por isquemia-reperfusión. Ratas Wistar macho fueron alimentadas con una dieta suplementada con 20% grasa de origen animal y 20% de fructosa. Luego de 8 semanas de las respectivas dietas, los animales fueron sacrificados bajo anestesia con ketamina 60 mg/kg y acepromazina 0,1 mg/kg (ip) y los corazones perfundidos según la técnica de Langendorff y sometidos a 10 minutos de isquemia regional. Al momento de la reperfusión se distribuyeron aleatoriamente en corazones control y poscondicionados mediante 3 ciclos de 30 segundos de reperfusión y 30 segundos de reoclusión de la arteria coronaria y se evaluaron los electrocardiogramas durante 10 minutos de reperfusión. Se analizó la incidencia de las arritmias de acuerdo a la Convención de Lambeth. Se confirmó el síndrome metabólico en todos los animales incluidos. El poscondicionamiento isquemico disminuyó la incidencia de fibrilación ventricular (2/10 vs C 9/10, P=0,0055 mediante prueba exacta de Fisher) y la duración (mediana 0 s RIQ 0-158 s vs C mediana 480 s RIQ 125-585 s, P <0,05 por Kruskal-Wallis). Otras arritmias ocurrieron en proporciones y duraciones similares en ambos grupos. Los resultados indican que el poscondicionamiento isquémico reduje las arritmias severas durante la reperfusión en corazones de animales con síndrome metabólico con incremento en la arritmogénesis.

558 (375) EFECTOS DEL COMPUESTO C (CC), INHIBIDOR DE LA KINASA ACTIVADA POR AMP (AMPK), EN LA AURÍCULA AISLADA DE RATA SOMETIDA A ISQUEMIA-REPERFUSIÓN SIMULADAS (IS-RS)

Romina Hermann; Victoria Mestre Cordero; María De Las Mercedes Fernandez Pazos; Federico Reznik; Debora Velez; Enrique Savino; María Gabriela Marina Prendes; Alicia Varela
Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. IQUIMEFA-CONICET

La AMPK, enzima que es activada con el incremento en la relación AMP/ATP, desempeña un papel clave en la regulación del metabolismo energético celular. Anteriormente mostramos que el CC (10μM) genera un menor descenso de la función contráctil durante la Is, disminuye la reserva contráctil y el contenido tisular de ATP al final de la Rs, sin afectar la producción energética en mitocondrias aisladas ni la viabilidad celular. Los objetivos fueron: estudiar el perfil de activación de la AMPK en la aurícula sometida a 75min Is-75min Rs, analizando la relación AMPKapThr172/AMPKatotal; evaluar el efecto del CC sobre la producción isquémica de lactato e investigar la relación entre la activación de la AMPK y la autofagia, mediante la relación LC3II/LC3I, indicador de formación de autofagosomas, y la proteína p62, degradada vía autofagosoma/lisosoma. Se emplearon aurículas izquierdas de ratas hembras estimuladas a 1Hz e incubadas isométricamente en Krebs-Ringer (glucosa 10mM). En la Is se reemplazó O2 por N2, glucosa por 2-desoxiglucosa 10mM, pH 6,8. Se empleó ANOVA, n=8. Los resultados mostraron activación de la AMPK durante la Is, que persistió durante la Rs disminuyendo gradualmente, y fue inhibida por el CC (fin estabilización:1,7±0,1*, Is:2,4±0,1, Is+CC:1,5±0,2 UA*;*p<0,05 vs Is). La producción de lactato se redujo significativamente cuando la Is se realizó en presencia del CC (Is vs Is+CC: 5,2±0,5 vs 3,0±0,9 μmol/g ps; p<0,01). Por otra parte, se observó un incremento en la relación LC3II/LC3I durante la Rs, que fue prevenido por el CC (fin estabilización:0,9±0,1*, Rs:1,7±0,1, Rs+CC:0,9±0,1 UA*;*p<0,05 vs Rs). La desaparición de p62 fue abolida en presencia de CC (fin estabilización:1,2±0,1*, Rs:0,6±0,1, Rs+CC:1,5±0,1 UA*;*p<0,05 vs Rs). Los resultados indican que en las presentes condiciones experimentales la AMPK es activada en la Is y persiste en la Rs. Sus efectos en la Is serían acompañados de un incremento de la glucólisis y del proceso de autofagia en la Rs.

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

099 (18) DOXORRUBICINA MODIFICA LA METILACIÓN DEL GEN CDKN2B Y LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA P15 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA

Laura C Gómez; Mayra L Sottile Fleury; Silvina B Nadin; Laura M Vargas-Roig
IMBECU

Introducción: Doxorrubicina (Doxo) es una de las drogas de primera línea utilizadas en el tratamiento del cáncer de mama. En células MCF-7 resistentes a Doxo, se han reportado cambios epigenéticos en genes relacionados con importantes mecanismos celulares. El hallazgo de marcadores moleculares que permitan predecir la respuesta a Doxo constituye un paso necesario para personalizar y optimizar el tratamiento. La metilación aberrante de Genes Supresores Tumorales (GSTs) se relaciona con la progresión tumoral y con la resistencia a drogas antineoplásicas. Basados en estos antecedentes nuestro objetivo consiste en determinar si Doxo modifica la metilación y/o expresión de GSTs en células tumorales maMarías. Metodología: Se utilizaron líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB231. Se realizó MS-MLPA (Methyl Specific-Multiplex Ligation Probe dependent Amplification) y Western Blot. Resultados: Se determinó el perfil de metilación de 36 GSTs de las mencionadas líneas celulares. Cada línea celular se expuso durante 24 h con la dosis IC50 de Doxo determinada por ensayo clonogénico (MCF-7 IC50=24,312nM y MDA-MB 231 IC50=22,23nM). Finalizado el tratamiento, se determinó nuevamente el perfil de metilación de los 36 GSTs. En la línea celular MDA-MB-231 no se observaron cambios en el perfil de metilación luego del tratamiento con Doxo. En la línea celular MCF-7, observamos que el gen CDKN2B, que se encontraba moderadamente metilado (0.51) antes de la administración de Doxo, se desmetiló completamente por efecto de la droga. La expresión de la proteína p15 (codificada por el gen CDKN2B), aumentó luego del tratamiento con Doxo. Conclusión: La administración de Doxo en células MCF7 disminuye la metilación del gen CDKN2B y aumenta la expresión de la proteína p15. Estudios moleculares combinados (epigenéticos y proteicos) podrían constituir novedosas herramientas que permitan al médico oncólogo personalizar el tratamiento antitumoral.

100 (189) IMPLICANCIA DEL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR LA TERAPIA FOTODINÁMICA EN LA FOSFORILACIÓN DE ERK1/2 Y SU PARTICIPACIÓN EN LA ACTIVACIÓN DE HIF

María Julia Lamberti; Natalia Belén Rumie Vittar; Viviana Alicia Rivarola
Univ. Nac. de Río Cuarto

La terapia fotodinámica (TFD) consiste en la aplicación de compuestos fotosensibilizadores (FSs) activables por luz de una determinada longitud de onda. El daño celular es producido por la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS). En estudios previos demostramos que las ROS inducidas por la TFD incrementan la actividad del factor inducible por hipoxia (HIF) en cultivos hipóxicos de carcinoma colorrectal (CCR). HIF es un factor de transcripción activado en respuesta a la disminución de la presión de O2 e involucrado en múltiples vías de supervivencia,. El rol que juegan las ROS en controlar la actividad de HIF involucra diversas señalizaciones intercelulares. Por ello, se propuso evaluar el rol del estrés oxidativo desencadenado por la TFD como estimulador de las vías PI3K/Akt y RAF/MEK/ERK, ambas involucradas en la regulación de HIF-1. Los esferoides de SW480-HRE (células de CCR reporteras de la actividad de HIF) fueron sometidos a condiciones letales del tratamiento fotodinámico, y se evaluó la activación de Akt y ERK1/2 (Western Blot), lo que demostró que sólo la vía de supervivencia ERK1/2 fue regulada positivamente por la intervención fotodinámica. Con el fin de determinar si la fosforilación inducida sobre ERK1/2 es relevante en la activación de HIF y en la adquisición de sensibilidad al tratamiento, los cultivos se incubaron con el inhibidor de dicha vía (U0126). Los resultados demostraron que la inhibición selectiva de ERK1/2 indujo una disminución de la actividad de HIF (citometría de flujo), así como un aumento en la susceptibilidad al tratamiento (MTT). A continuación, se demostró que la inhibición del estrés oxidativo (antioxidante NAC) suprimió la activación de la vía RAF/MEK/ERK (Western Blot). Estos resultados permitieron identificar por primera vez el eje TFD→ROS→ERK1/2→HIF, y la influencia de estos mediadores moleculares en la sensibilidad a la TFD de los microtumores de CCR.

101 (254) PAPEL DE LA HUMANINA EN LA SUPERVIVENCIA DE LAS CELULAS DE CARCINOMA MAMARIO

Florencia Gottardo; Mariela A. Moreno Ayala; Antonela S. Asad; Gabriela Jaita; Maríanela Candolfi; Adriana Seilicovich
INBIOMED (UBA-CONICET)

La Humanina (HN) es un péptido de origen mitocondrial que tiene una potente acción citoprotectora en células normales. Ha sido descripto que la HN endógena o exógena puede proteger células de tejidos normales frente a los efectos tóxicos de la quimioterapia. Sin embargo, el papel de este péptido en la patogenia tumoral es aún muy poco conocido. Recientemente ha sido demostrado que la HN está sobreexpresada en células de cáncer gástrico, sobre las cuales ejerce una actividad antiapoptótica. El objetivo del presente trabajo fue evaluar si la HN está involucrada en la resistencia de las células de cáncer de mama a un estímulo citotóxico. La expresión de HN fue evaluada por inmunofluorescencia en células de carcinoma mamario murino 4T1. Observamos una expresión intensa de HN en el núcleo y en el citoplasma en el 100% de las células. Además, para evaluar la función de la HN en estas células utilizamos la deprivación de suero como estímulo citotóxico. Mediante la incorporación

de BrdU (ELISA), observamos que la HN revirtió la inhibición de la proliferación de células 4T1 inducida por la deprivación de suero de manera dosis dependiente (suero=0.89±0.06; sin suero=0.71±0.02*, 0.5μM HN=0.63±0.04*, 5μM HN=0.83±0.02, 10μM HN=0.88±0.02, *:p<0.05 vs suero). También, mediante la técnica de TUNEL observamos que la deprivación de suero es un buen inductor de apoptosis en estas células (suero=0.7%; sin suero=2.0%, p<0.05). La incubación de células 4T1 con HN (10μM) por 24 hs revirtió el efecto proapoptótico de la deprivación de suero (suero: 1.2%; suero+HN: 1.5%; sin suero: 4.4% sin suero+HN: 1.2%, p<0.01 vs su control correspondiente, X2). Nuestros resultados sugieren que la HN cumple un papel citoprotector ante estímulos proapoptóticos y antiproliferativos en células tumorales maMarías. De esta forma, la HN podría ser un blanco terapéutico para la sensibilización de las células de cáncer de mama a tratamientos citotóxicos.

102 (333) EFECTO DEL ÁCIDO 20-HIDROXIEICOSATETRANÓICO (20-HETE) EN LA VIABILIDAD CELULAR DE LÍNEAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA HUMANO

Cecilia Colombero[1]; Daniela Papademetrio[2]; Elida Alvarez[2]; Susana Nowicki[1]
CEDIE-CONICET FEI - División de Endocrinología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez[1] Cátedra de Inmunologìa - IDEHU, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA/ CONICET[2]

El 20-HETE es un producto del metabolismo del ácido araquidónico por el citocromo P450, y participa en varios procesos tumorales. Sin embargo, su rol en el cáncer de próstata no ha sido aún explorado. Nuestro objetivo fue evaluar la función del 20-HETE en la viabilidad celular en líneas de cáncer de próstata humano. Se utilizaron las líneas celulares LNCaP (andrógeno sensible) y PC-3 (andrógeno insensible); cultivadas en medio completo (MC) o deprivado de esteroides (MDE). Se realizaron estímulos diarios con 20-HETE o con el inhibidor específico de su síntesis (HET0016, 1-10 uM). Se evaluó viabilidad celular por ensayo de MTT y apoptosis por ensayo de TUNEL y Western Blot. En MC, el HET0016 (5 días) redujo la viabilidad de LNCaP (en%: Control (C), 100±3; 1uM, 30±3*; 10uM, 14±2*); este efecto fue debido, al menos en parte, al aumento de células TUNEL+ del 2% (C) al 36% (10uM). En cambio, la viabilidad de PC-3 no se alteró. En MDE la dihidrotestosterona (DHT, 0.1nM, 5 días) aumentó la viabilidad de LNCaP, siendo este efecto inhibido por el HET0016 (en%: C, 101±4; DHT, 266±13*; DHT+HET0016 10uM, 152±11#). Asimismo, la disminución de células TUNEL+ por DHT fue revertida por HET0016 (C, 19%; DHT, 2%; DHT+HET0016, 13%). El 20-HETE (50nM, 5 días), aumentó la viabilidad de LNCaP en MDE (en%: C, 100±5; 20-HETE, 150±6*) y disminuyó la cantidad de células TUNEL+ (C, 23%; 20-HETE, 7%). Por el contrario, no tuvo efecto en PC-3. El clivaje de PARP en LNCaP aumentó por HET0016 en MC y disminuyó por el 20-HETE en MDE. Nuestros resultados indican que en células tumorales de próstata andrógeno sensibles el mantenimiento de la viabilidad celular requiere de la producción de 20-HETE, y que su inhibición induce apoptosis resultando en el clivaje de PARP nuclear. El agregado de 20-HETE a un medio sin esteroides, provoca un aumento de la viabilidad también relacionado a la disminución de la apoptosis celular. (* $p \leq 0{,}0001$ vs C; # $p \leq 0{,}0001$ vs DHT según ANOVA seguido del test de Bonferroni).

103 (419) EFECTOS ANTITUMORALES DE LA FRACCIÓN D DE MAITAKE (GRIFOLA FRONDOSA) EN CÁNCER DE MAMA

Eliana Noelia Alonso[1]; María Julia Ferronato[1]; Norberto Ariel Gandini[1]; María Eugenia Fermento[1]; Diego Javier Obiol[1]; Julian Arevalo[2]; María Marta Facchinetti[1]; Alejandro Carlos Curino[1]
Laboratorio de Biología del Cáncer, INIBIBB-CONICET, Bahía Blanca, Argentin[a1] Servicio de Patología del Hospital Interzonal de Agudos Dr José Penna, Bahía Blanca, Argentina[2]

La Fracción D es un extracto de proteoglucanos obtenido del hongo medicinal Grifola frondosa (Maitake). Su efecto antitumoral ha sido atribuido principalmente a la capacidad inmunomoduladora. Sin embargo, previamente demostramos que la Fracción D actúa también directamente sobre células tumorales maMarías (LM3, MDA-MB-231 y MCF7) modulando la expresión génica, disminuyendo la viabilidad y capacidad migratoria. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la Fracción D sobre los procesos celulares que contribuyen al desarrollo y progresión del cáncer mamario. Acompañando a la disminución de la capacidad migratoria de las células LM3 inducida por la Fracción D, observamos que el tratamiento con el proteoglucano disminuyó la invasividad de dichas células (65,67± 2,1 vs 58,67± 2,3; p<0,05). En correlación con esto, observamos que la Fracción D reorganizó el citoesqueleto de actina de las células LM3, disminuyendo el número de lamelipodios/filopodios (47,86 ± 5,3 vs 29,55 ± 1,1; p<0,05). Más aún, la Fracción D aumentó la adhesión de las células LM3 (p<0,001), contribuyendo a la inducción de un fenotipo tumoral menos maligno. Los efectos antitumorales de la Fracción D demostrados in cultivo fueron corroborados in vivo. En un modelo murino de trasplante singenéico con LM3, el tratamiento de los ratones con la Fracción D disminuyó el volumen y el peso tumoral (1,81 cm3 vs 0,99 cm3; 1,69 g vs 0,94 g; p<0,05) en comparación con el vehículo. La Fracción D aumentó la expresión de Bax (0,4 vs 1,9; p<0,05) en los tumores mamarios de los ratones, mientras que no afectó la expresión de Ki-67 ni el índice mitótico. Observamos también que el tratamiento con la Fracción D disminuyó el número de metástasis pulmonares en los ratones (p<0,05). En conclusión, resultados in cultivo e in vivo sugieren que la Fracción D afecta el crecimiento tumoral y el proceso metastático inhibiendo la viabilidad celular, favoreciendo la adhesión y disminuyendo la migración e invasión.

104 (222) VÍAS DE SEÑALIZACIÓN REGULADAS POR ACIL-COA-SINTETASA-4: POSIBLES NUEVOS BLANCOS TERAPÉUTICOS COMBINADOS TRABAJANDO EN FORMA SINÉRGICA PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES DE MAMA TRIPLE NEGATIVOS Y REFRACTARIOS AL TRATAMIENTO HORMONAL

Ulises Daniel Orlando; Ana Fernanda Castillo; Melina Dattilo; Angela Rosaria Solano; Paula Maríana Maloberti; Ernesto Jorge Podestá
INBIOMED

La acil-CoA-sintetasa-4 (ACSL4), de alta especificidad para el ácido araquidonico se encuentra expresada en la región tumoral a diferencia del tejido normal circundante, en cáncer de mama denominado triple negativo y en el refractario al tratamiento hormonal, ambos de mal pronostico, con tratamientos poco eficaces con alta toxicidad. Hemos demostrado in vitro e in vivo que ACSL4 juega un papel casual en la regulación de la agresividad tumoral. Estudiamos por transcriptoma y proteómica funcional los mecanismos moleculares utilizados por ACSL4 para su acción, en celulas MCF7 que sobrexpresan ACSL4 bajo el control de doxiclina, comprobando la activación de varias vías de señalización, siendo los dos componentes del sistema mTOR, mTORC1 (un complejo multiproteíco rapamicina- y nutriente-sensitivo) y mTORC2 (un complejo sensitivo a factores de crecimiento e insensitivo a nutrientes), los que presentan mayor activación (p<0.001). Se incrementa la fosforilación de mTOR en Ser 2448, de la proteína quinasa S6 en Thr 389, la proteína S6, en Ser 235/236, 240/244, de AKT en Ser 543, de Rictor en Thr 1135, una sub-unidad del mTORC2 y del factor de iniciación 4E-BP1 en Ser 65, el cual incrementa la disponibilidad del factor de iniciación eIF4E. Los resultados fueron confirmados en otros dos modelos de cáncer de mama. Estudiando el papel funcional de esta regulación, utilizando dosis submaximas de inhibidores de la vía mTOR y de ACSL4 obtuvimos un efecto inhibitorio sinérgico significativo (p<0.01) sobre la proliferación celular. También demostramos que la inhibición de ACSL4 aumenta los niveles de expresión de ERa, permitiendo la restauración de la sensibilidad al tamoxifeno, observando un efecto significativo sinérgico (p<0.001) en la inhibición de la proliferación celular en células MDA-MB-231 triple negativa.

Estos efectos podrían dar lugar a una estrategia terapéutica que permita la reducción de las dosis efectivas altamente toxicas en tumores que sobre-expresen ACSL4.

105 (26) ESTUDIO CITOGENETICO POR ACGH EN BLASTOCISTOS PREIMPLANTADOS DE PORTADORES DE REARREGLOS ESTRUCTURALES BALANCEADOS

María Eugenia Ducatelli; Andressa Grazziotin Mondadori; Laura Gómez Patti; Fabian Coco; Nicolas Neuspiller; Fernando Gismondi; Roberto Coco
Fecunditas

Es conocido que los portadores de rearreglos cromosómicos tienen mayor riesgo para generar gametas aneuploides, las cuales originan embriones anormales, la mayoría letales en etapas pre implantatoria y post implantación. Solo una minoría llegan a término y originan nacidos con cromosomopatías. La mayoría de los datos de estudio cromosómico en portadores de rearreglos corresponden a embriones en día 3 de desarrollo y abordados en su mayoría por FISH o qfPCR de los cromosomas involucrados en el rearreglo. El objetivo del presente fue determinar el riesgo de desbalance cromosómico en el estadio de blastocisto, considerado el mismo como la selección natural del mejor. La serie estuvo compuesta por 26 pacientes portadores de rearreglos: 5 inversiones pericéntricas, 4 fusiones céntricas y 17 translocaciones recíprocas. Las motivaciones fueron abortos recurrentes, nacidos malformados y esterilidad priMaría. Previo al PGD se evalúo la reserva ovárica y el espermograma. La estimulación ovárica fue realizada con gonadotrofinas recombinantes y agonistas o antagonistas del GnRH. Se realizó ICSI y se cultivó hasta blastocisto. En D3 o D4 se perforó la zona pelúcida para facilitar la eclosión del trofoblasto. Las células eclosionadas fueron aspiradas y entubadas en un eppendorf para su posterior amplificación y realización del aCGH con la plataforma 24 Sure Plus BlueGnome-Illumina. Los blastocistos biopsiados fueron vitrificados para su posterior transferencia uterina con endometrio preparado con estrógenos y progesterone El promedio de ovocitos aspirados fue 16,2 (r:5-46), el promedio de ovocitos fecundados normales fue 11,1 (r:2-26) y el promedio de blastocistos fue 4,8(r:1-11). De los 63 blastocistos biopsiados en el grupo de translocaciones recíprocas, 42,9% resultaron normal, 36,5% anormal debido a una alteración relacionada con la translocación y 20,6% con anomalías no relacionadas. De los 23 blastocistos de las fusiones céntricas el 57,8% resultó normal, 17,4% con anomalías relacionadas a la fusión y 34,8% con anomalías no relacionadas. De los 24 blastocistos provenientes de las inversiones pericéntricas, el 56,5% resultó normal, 13% con anomalías relacionadas y 30,5% con anomalías no relacionadas. Los resultados hallados evidencian que la llegada a blastocisto disminuye sustancialmente el riesgo teórico esperado en la fecundación. Por otro lado, como no todos los ovocitos fecundados llegan a blastocisto, se reduce el número de biopsias y de estudios. Estos hechos no son menores si se tiene en cuenta el costo de los mismos.

106 (317) EFECTO DE LA DISMINUCIÓN DE LA TENSIÓN DE OXIGENO SOBRE LA EXPRESIÓN DE NHE-3 EN PLACENTA HUMANA

Valeria Dietrich[1]; Mauricio Di Paola[14]; Bernardo Maskin[2]; Maríana Farina[3]; Alicia E Damiano[14]
Ifibio Houssay[1] Hospital Nacional "Dr Prof. Alejandro Posadas"[2] CEFYBO[3] Cát de Biología Celular y Molecular, Fac de Farmacia y Bioquímica, UBA[4]

La hipoxia intermitente es crucial en el desarrollo de preclampsia (PE),donde los períodos de isquemia/reperfusión y la expresión sostenida del factor inducible por hipoxia (HIF-1α) producirían daños sobre el trofoblasto,alterando sus funciones. Previamente, en placentas preeclámpticas informamos una disminución en la expresión del intercambiador Na^+/H^+ tipo 3 (NHE-3),principal regulador del pH intracelular.Sin embargo,se desconoce si la expresión del NHE-3 placentario responde a cambios en la tensión de O_2.Nuestro objetivo fue evaluar si el NHE-3 está regulado por cambios en la tensión de O_2 en placenta humana. Se evaluó la expresión de NHE-3 en un modelo de cultivo de explantos de placenta humana normal bajo distintas condiciones de oxigenación o bien tratados con $CoCl_2$,estabilizador del HIF-1α.Por estudios in silico,se analizó la presencia de elementos de respuesta a hipoxia (HRE) en el promotor de NHE-3 humano. Los experimentos in vitro revelaron que en hipoxia el transcripto de NHE-3 aumentó mientras que la proteína disminuyó significativamente ($p<0.05$).Esta disminución revirtió luego del agregado de MG-132 (inhibidor de la degradación proteasomal).En hipoxia/reoxigenación,encontramos una disminución significativa de la expresión transcripcional y proteica de NHE-3 ($p<0.05$),patrón similar al de placentas preeclámpticas.Los estudios in silico mostraron un sitio probable para HRE en el promotor de NHE-3. Sin embargo,el tratamiento con $CoCl_2$ no produjo cambios a nivel transcripcional sugiriendo que HIF-1α no actuaría directamente sobre NHE-3.Por otro lado,al igual que en hipoxia,la expresión proteica disminuyó,efecto que fue revertido con MG-132.Estos resultados sugieren que el aumento de HIF-1α por la hipoxia no regularía la expresión transcripcional del NHE-3,aunque induciría su degradación proteasomal que no podría ser revertida por la posterior reoxigenación.Esto afectaría la homeostasis del trofoblasto que conduciría al desencadenamiento de la PE.

443 (448) EL FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS B (PDGFB) MEJORA LA FUNCIONALIDAD OVÁRICA EN MODELO DE SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO (PCOS)

Maríana Di Pietro[1]; Leopoldina Scotti[1]; Griselda Irusta[1]; Marta Tesone[12]; Fernanda Parborell[1]; Dalhia Abramovich[1]
IBYME[1] Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires[2]

El PCOS es la alteración endócrina más frecuente en mujeres en edad fértil. Es un síndrome heterogéneo y se caracteriza por presentar hiperandrogenismo, oligomenorrea y ovarios poliquísticos con fallas en la fertilidad. Debido a que no se conoce su etiología, las terapias actuales solo apuntan a disminuir los síntomas. Las pacientes con PCOS poseen además alteraciones en la angiogénesis ovárica. Se han encontrado altos niveles del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), un aumento en el sistema de angiopoyetinas (ANGPTs) y una disminución en el sistema de PDGF. Hipótesis: La administración local de PDGFB mejora la angiogénesis ovárica y favorece el desarrollo folicular y la tasa la ovulación disminuyendo la formación de quistes. Métodos: utilizamos un modelo de PCOS en rata por administración de DHEA. Un grupo de ratas PCOS fue operado en el día 15 de tratamiento y se le administró 25 ng de PDGFB recombinante en forma intraovárica. Otro grupo de ratas PCOS recibió vehículo. Al día 16 las ratas fueron sacrificadas y se extrajeron los ovarios. Resultados: Al igual que en humanos, encontramos una disminución del sistema de PDGF en ovarios de ratas PCOS. La administración local de PDGFB disminuyó el% de folículos primordiales y los niveles de la Hormona Anti-Mülleriana (AMH). Además, el tratamiento con PDGF disminuyó el% de quistes y aumentó el% de cuerpos lúteos (CL). Analizamos el número de ratas con CL en cortes histológicos como una medida indirecta de ovulación. Este número aumentó luego de la administración de PDGFB. Además, PDGFB restableció el% de área de células peri-endoteliales, disminuyó los niveles ováricos de ANGPT1 sin cambios en VEGF. Conclusión: La administración local de PDGFB mejorara la estabilidad vascular ovárica. Esto favorecería la llegada de nutrientes, hormonas y factores de crecimiento a los folículos, lo que permitiría mejorar el desarrollo folicular, la tasa de ovulación y disminuir la formación de quistes en ovarios PCOS.

108. (379) EPIGENÉTICA EN EL ESPERMATOZOIDE: PROTAMINAS Y DESCONDENSACIÓN CROMATÍNICA

Maite Yael Cambiasso[1]; Yamila Raquel Juárez[1]; Vanina Laura Julianelli[3]; Marina Romanato[1]; Lucrecia Piñeiro De Calvo[1]; Juan Carlos Calvo[12]
IBYME[1] Departamento de Química Biológica, FCEyN-UBA[2] PROCREARTE[3]

La epigenética puede modificar la expresión génica del espermatozoide y condicionar la fecundación y el desarrollo del embrión. Entre los factores epigenéticos, se encuentran la posible metilación de protaminas (Pr), el contenido de las mismas y la relación Pr1/Pr2, que podrían afectar la descondensación cromatínica del espermatozoide. (1) Presentamos el aislamiento, electroforesis, cuantificación y caracterización por Western blot (WB) de Pr. El semen de donantes normozoospérmicos (OMS) se lavó en buffer Tris/NaCl y resuspendió en buffer con SDS. Luego de sonicar se separaron los núcleos en colchón de sacarosa. El precipitado nuclear se lavó con PMSF y las proteínas se aislaron con urea y DTT y tratamiento posterior con etanol frío, HCl y TCA. Luego de electroforesis ácida se analizó por WB la presencia de Pr1 y Pr2; otro gel se analizó digitalmente para obtener la relación cuantitativa entre Pr. Demostramos la presencia de Pr1 y Pr2, de los posibles productos de procesamiento y/o modificación postraduccional de esta última y generamos una curva de calibración para cuantificar la relación Pr1/Pr2 en muestras de pacientes. (2) Evaluamos la descondensación cromatínica in vitro de espermatozoides de donantes normozoospérmicos, previamente incubados en condiciones capacitantes, con heparina (H) y/o dermatán sulfato (DS) y GSH. Ambos glicosaminoglicanos (GAGs) descondensaron la cromatina espermática, aunque con diferente potencia (DS vs H $p<0.05$, n=10, ANOVA / Dunn). El análisis in silico de Pr1, Pr2, H y DS indicó una distribución diferencial de cargas que podría explicar la descondensación diferencial en presencia de uno u otro GAG. Conclusión: Evaluar la presencia de Pr1 y Pr2 y su relación y al mismo tiempo analizar la descondensación in vitro con H y/o DS en muestras de pacientes infértiles brindaría la posibilidad de comenzar el abordaje hacia la identificación de factores epigenéticos que podrían estar vinculados con la infertilidad masculina. Subsidio: CONICET-ANPCYT-Fundación René Barón

HEMATOLOGÍA 1 Y NEFROLOGÍA 1

109 (169) TABAQUISMO, HÁBITOS DIETARIOS Y POLIMORFIS- MOS EN LOS GENES METABOLIZANTES DE XENOBIÓTI- COS GSTT1, GSTM1 Y CYP1A1: ESTUDIO CASO-CONTROL EN ENFERMEDADES ONCOHEMATOLÓGICAS

María Belen Cerliani[1]; Ignacio Miguel[1]; Juan Antonio Gili[2]; Graciela Klein[3]; Silvia Saba[3]; Walter Pavicic[1]; Silvina Richard[1]
Lab. de Citogenética y Mutagénesis, IMBICE (CIC-CONICET), La Plata[1] Laboratorio de Epidemiología Genética, ECLAMC-CEMIC-CONICET, Buenos Aires[2]Unidad de Diag., Trat. y Sostén de Enfermedades Hematológicas, HIGA "Prof. Dr Rossi", La Plata[3]

Los polimorfismos en los genes metabolizantes de xenobióticos y los niveles de exposición a sus sustratos podrían impactar en la susceptibilidad al cáncer. Los genes GSTM1 y GSTT1 (glutatión S-transferasa M1 y T1) participan en la detoxificación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y ROS, pueden presentar deleción y la ausencia de actividad se asoció a distintos tipos de cáncer. CYP1A1 (citocromo P450 1A1) también interviene en la metabolización de HAPs y presenta un SNP (CYP1A1*2A) asociado a susceptibilidad al cáncer. El estilo de vida y los hábitos dietarios constituyen factores de riesgo adicionales. Se conoce poco de los factores de riesgo que desarrollan enfermedades oncohematológicas, excepto ciertas alteraciones genéticas y exposiciones ambientales. Nuestro objetivo fue analizar la asociación entre enfermedades oncohematológicas y polimorfismos en GSTT1/GSTM1/CYP1A1, hábitos dietarios y tabaquismo. Se diseñó un estudio caso-control, con 125 casos (leucemia/linfoma/mieloma) y 310 controles (16-89 años). Previo consentimiento informado, se tomaron muestras de sangre y se les realizó una encuesta a los pacientes que concurren al HIGA "Dr Rossi" (La Plata). Las deleciones de GSTs se determinaron mediante PCR multiplex, y los alelos de CYP1A1 mediante PCR-RFLP, con posterior visualización en gel de agarosa. Los análisis estadísticos se realizaron con STATA. Respecto del tabaquismo, los ex-fumadores mostraron un aumento en el riesgo de enfermedad (OR=1.67, IC95% 1.03-2.71, p=0.04). Entre los factores dietarios, el consumo de carnes asadas 3 o más veces/mes se asoció a mayor riesgo de enfermedad (OR=1.72, IC95% 1.08-2.75, p=0.02), al igual que el consumo diario de café (OR=1.77, IC95% 1.03-3.03, p=0.03). No se encontró asociación entre las patologías y el consumo de alcohol o de conservas, deleción de GSTM1/GSTT1, o el polimorfismo CYP1A1*2A. Futuros análisis incluirán una evaluación de las interacciones entre los genotipos y los hábitos de vida.

110 (346) VALIDACIÓN DE CONDICIONES DE PROCESAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS DE SANGRE PARA LA DETERMINACIÓN DEL MARCADOR DE ACTIVACIÓN DE LA VÍA ALTERNATIVA DEL COMPLEMENTO C5B-9 EN PACIENTES CON MICROANGIOPATÍA TROMBÓTICA (MAT)

Célia Dos Santos[1]; María F. Alberto[1]; Juvenal Paiva[1]; María M. Casinelli[1]; María A. Lazzari[2]; Ana C. Kempfer[2]; Analía Sánchez-Luceros[12]
Academia Nacional de Medicina[1] IMEX-CONICET[2]

C5b-9 ha surgido como un posible marcador para el diagnóstico y monitoreo de MATs. El análisis de biomarcadores del complemento es afectado por factores pre-analíticos que generan resultados imprecisos. Además, en agudo, las muestras de pacientes son derivadas de diferentes centros de internación a lo largo del país, muchos de los cuales no cuentan con equipo de laboratorio especializado. Nuestro objetivo fue evaluar condiciones críticas de procesamiento y almacenamiento de muestras de 4 donantes sanos (D1-D4) y 2 pacientes con Síndrome Urémico Hemolítico atípico (P1-P2) para el análisis de C5b-9 (ELISA; BD Biosciences). La sangre fue colectada en EDTA 1,5 mg/ml o citrato de sodio 3,13% (CIT), procesada enseguida a temperatura ambiente (TA) o 4°C, o después de 24 o 48h almacenada a 4ºC. Se fraccionó el plasma, centrifugando a 4°C y trasvasándolo entre 2 ciclos: (i)2x1000g/10min (ii)1x1000g/10min; 1x12000g/2min. Fue procesado enseguida, o congelado (-70ºC) para determinación ulterior. Se comparó temperatura de descongelación: 37ºC/TA/4ºC. Los niveles de C5b-9 fueron similares entre muestras EDTA y CIT procesadas inmediatamente a 4°C (D1 y P1: p=ns). Los niveles aumentaron entre muestras EDTA y CIT procesadas a 4°C y a TA respectivamente (D4: $p<0.05$; P2: $p<0.01$). También se observó un aumento en las muestras CIT comparado a las EDTA congeladas (D1: $p<0.05$). La concentración de C5b-9 aumentó de 33-56% en las muestras D1-D2-D3 (i) vs. (ii). C5b-9 en el plasma de D2 y D3 permaneció estable en sangre almacenada hasta 24h. D1 descongelado a 37ºC y a TA mostró activación de C5b-9 de 128% ($p<0.001$) y 100% ($p<0.05$) respectivamente. La descongelación a 4°C no indujo activación in vitro de C5b-9. En conclusión, se recomienda la recolección de sangre en EDTA, su procesamiento dentro de 24h y el fraccionamiento así como la descongelación del plasma a 4ºC. Tomando estos recaudos, se pueden obtener resultados válidos y reproducibles de C5b-9 en pacientes con MAT.

111 (484) ERITROPOYETINA Y ERITROPOYETINA CARBAMILADA EN LA MIGRACIÓN ENDOTELIAL

Romina Eugenia Maltaneri; Agustina Schiappacasse; María Eugenia Chamorro; Alcira Beatriz Nesse; Daniela Cecilia Vittori
Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales UBA - IQUIBICEN CONICET

La eritropoyetina (Epo) es reconocida por sus efectos hematopoyéticos, y más recientemente, cardiovasculares, como la angiogénesis y la cardioprotección. A diferencia de Epo, su derivado carbamilado (cEpo) no estimula la migración de células endoteliales. Con el objetivo de explicar dicha diferencia, evaluamos la participación de diferentes mecanismos mediante ensayos de scratching y técnicas de citometría de flujo en cultivos de la línea endotelial humana EA.hy926. Dada la relación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) con la migración celular, estudiamos

su rol como mediadoras del efecto de Epo. Si bien el antioxidante N-acetil-cisteína (NAC, 5 μM) inhibió significativamente la migración inducida por Epo 200 ng/mL (Sin suero: 26±1,5%; *Epo: 39±2,8%; Epo + NAC: 27±3,0%; *p<0,05; n=7) a 15h, en ese mismo tiempo Epo tendió a disminuir las ROS generadas en ausencia de suero (citometría de flujo). La participación de óxido nítrico sintasa (NOS) fue estudiada como otro mecanismo del efecto promigratorio de Epo. Al igual que lo observado para factores angiogénicos como VEGF, la inhibición de NOS por N-metil-L-arginina (NMLA) impidió significativamente la migración inducida por Epo a 15 h (Epo: 33±1,0% vs. Epo + NMLA: 25±1,3%, p<0,05; n=6). Considerando que la ausencia de efecto de cEpo en células eritroides se debería a una mayor actividad de la fosfatasa PTP1B, que inactiva el receptor de eritropoyetina, investigamos su participación en la respuesta diferencial del endotelio a estos factores. El tratamiento con un inhibidor específico de PTP1B (CinnGel2Me, 20 μM) revirtió significativamente la incapacidad de cEpo (200 ng/mL) de estimular la migración endotelial a 15 h (cEpo: 27±1,7% vs. cEpo + CinnGel: 34±2,0%; p<0,05; n=5). Estos resultados sugieren la participación de NOS en el efecto promigratorio de Epo, y señalarían a la fosfatasa PTP1B en el efecto diferencial de Epo y cEpo sobre la migración endotelial, como se ha descrito en células eritroides.

112 (633) ROL DE FACTORES HUMORALES Y LINFOCITOS T EN LA APOPTOSIS DE PLAQUETAS EN TROMBOCITOPENIA INMUNE (PTI)

Nora Paula Goette[1]; Matias Grodzielski[1]; Paola Roxana Lev[1]; Ana Claudia Glembotsky[1]; Marta Susana Pierdominicci[2]; Dardo Riveros[3]; Alejandro García[3]; Felisa Concepción Molinas[1]; Paula Graciela Heller[1]; Rosana Fernanda Marta[1] IDIM[1]

Htal. Gral. De Agudos "Ramos Mejia"[2] CEMIC (Ctro. De Educacion Medica e Inv. Clinica)[3]

En un estudio previo demostramos aumento de apoptosis en plaquetas de pacientes con PTI. Con el objetivo de investigar el mecanismo por el cual se produce esta anormalidad, en el presente trabajo evaluamos el efecto del plasma de pacientes con PTI en la apoptosis de plaquetas normales (PN), en presencia y ausencia de linfocitos CD3+ del mismo donante (LT). Se estudiaron 18 pacientes diagnosticados según criterios actuales. Se obtuvo plasma recalcificado de pacientes y controles. Los plasmas fueron incubados ya sea en presencia de PN o de PN+LT durante 1 hr a 37ºC. Luego de lavar para eliminar el plasma, se evaluaron los parámetros de apoptosis: expresión porcentual de fosfatidilserina (PS) y de caspasa 3 activa (casp3a) y la variación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$m) por citometría de flujo. Se observó una tendencia a mayor apoptosis en presencia de plasma de PTI en las PN (pacientes vs controles: PS 8.3±4 vs 6.5±2; casp3a 17.6±4 vs 12.5±5; ambos p=NS; $\Delta\psi$m 3.9±1 vs 5.1±2 p=0,03). En presencia de LT, los plasmas de PTI (n=6) indujeron un franco aumento de exposición de PS (p=0,038) en PN respecto a los plasmas control (n=4). Para estudiar si los auto-anticuerpos son los responsables del efecto apoptótico, se realizó la incubación de PN+LT en presencia de plasma de PTI previamente incubado con plaquetas normales para adsorber los auto-anticuerpos . En estas condiciones se revirtió el efecto apoptótico observado en los correspondientes plasmas completos (p=0,0055). Estos resultados sugieren la presencia de factores humorales en el plasma de pacientes con PTI que per se disminuyen la sobrevida plaquetaria, además de un efecto citotóxico de los auto-anticuerpos, principalmente en presencia de los linfocitos T actuando como células efectoras.

113 (635) MODULACIÓN DE PROTEÍNAS CITOPLASMÁTICAS QUE RESPONDEN AL HIERRO SOBRE IMPORTADORES DEL HIERRO EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO TRATADAS CON INDUCTORES DE INFLAMACIÓN Y DE ESTRÉS OXIDATIVO

Gisela Giorgi[1]; Pamela Urrutia[2]; Marta Elena Roque[1]; Marco Tulio Nuez[2]

Laboratorio de Fisiología Humana, INBIOSUR,Universidad Nacional del Sur[1] Laboratorio de Biología del Envejecimiento, Departamento de Biología, Universidad de Chile[2]

La expresión de proteínas que regulan el hierro celular depende del sistema de proteínas citoplasmáticas que responden al hierro (IRP) y de elementos regulados por hierro (IRE). Se propone estudiar en células neuronales la modulación por IRP de la expresión del transportador de metales divalentes1 (DMT1) en presencia de inductores de inflamación y de estrés oxidativo Materiales y Métodos. Células 1)SH-SY5Y; 2)SH-SY5Y knockdown para IRP1 (C9); 3)SH-SY5Y transfectadas con vector puro (Puras) +(TNFα, IL6,LPS) por 18 hs; SH-SY5Y con o sin N-acetilcisteína (NAC). Western Blot: para DMT1,IRP1 y RTf. RTf. PCR: para DMT1, IRP1, actina. EMSA: actividad de IRP1, sonda de ARN con secuencia IRE marcada con biotina, incubada con extractos citosólicos. Estadística: p‹0.05, ANOVA-Test de Tukey. Resultados: SH-SY5Y+TNFα+IL6+LPS sin NAC: la actividad de IRP1 aumentó respecto al control, sin cambios en los niveles proteicos. DMT1 aumentó en células +TNFα+IL6 por WB, con tendencia a aumentar con LPS, respecto al control (p<0,05). El ARNm de DMT1 y RTf no cambió. SH-SY5Y+(TNFα,IL6,LPS) con NAC aumentó la actividad de IRP1; sin cambios en sus niveles proteicos. Con NAC, disminuyó DMT1 en células +LPS+IL-6, con tendencia a disminuir con TNFα, respecto a células sin NAC (p<0,05). El tratamiento con NAC, disminuyó el nivel de RTf en células +TNFα y con tendencia disminuir con +LPS+IL-6, respecto a las células sin NAC (p<0,05). C9: El nivel de ARNm y la actividad de IRP1 disminuyeron en C9 sin tratar respecto a células puras sin tratar(p<0,05). En el C9 +TNFα+IL6+LPS, la expresión de IRP1 aumentó con respecto al control; sin cambios de actividad. En C9+TNFα+IL6+LPS aumentó el nivel proteico y el ARNm de DMT1. Concluimos que en células SH-SY5Y en inflamación, DMT1 es modulado post-transcripcionalmente por IRP independiente de ROS y en "knockdown" para IRP1 por otra vía, evidenciando que IRP1 no es el único mecanismo del control de DMT1 en inflamación

114 (367) EFECTO DE ESTRADIOL SOBRE LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN CULTIVOS PRIMARIOS Y TRI-DIMENSIONALES DE CÉLULAS EPITELIALES TUBULARES DE CORTEZA RENAL HUMANA

Laura B Marquez[1]; Fernando Ibarra[12]; Claudia Silberstein[1]

Lab. de Investigaciones Biomédicas, IFIBIO Houssay CONICET, Departamento de Ciencias Fisiologicas, Facultad de Medicina, UBA[1] Lab. de Riñón Experimental, Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari, UBA[2]

La capacidad de recuperar la función renal luego de un daño depende de la habilidad de los túbulos renales de regenerarse. Hay estudios que demuestran que la función ovárica tiene efectos protectores sobre el riñón, posiblemente debido a las hormonas sexuales femeninas. En estudios previos (SAFIS 2014), demostramos que el tratamiento con benzoato de estradiol estimuló la proliferación celular y la tubulogénesis en cultivos primarios de células epiteliales tubulares de la corteza renal humana (CERH). El objetivo del presente trabajo fue estudiar la vía de acción de 17β-estradiol sobre la regulación de la proliferación de cultivos de CERH primarios y tridimensionales (3D-CERH). Los cultivos primarios de CERH se desarrollaron a partir de nefrectomías realizadas en el Hospital Nacional Prof. A. Posadas. Se evaluó la tasa de proliferación celular por incorporación de bromodeoxiuridina en las CERH y en estructuras tubulares de cultivos 3D crecidos en matrigel. El tratamiento con 17β-estradiol (10 nM) estimuló significativamente la proliferación celular de las CERH respecto a las células control (p<0,05, n=3). La incubación de las CERH con ICI-182780 (10 y 100 nM), inhibidor de receptores ER, inhibió el efecto de 17β-estradiol sobre la proliferación celular. Por otro lado, el tratamiento con dibutiril AMPcíclico (dbAMPc, 1mM) redujo significativamente (p<0,05, n=3) la proliferación tanto en las CERH como en las estructuras tubulares de cultivos 3D-CERH, aún en presencia de 17β-estradiol. Los efectos de estrógenos son mediados por la unión a sus receptores nucleares ERa y ERb que actúan como factores de transcripción nuclear y/ó por la unión al receptor de membrana GPR30, estimulando adenilato ciclasa y AMPc. En base a nuestros resultados podemos concluir que el efecto de estradiol sobre la proliferación de CERH estaría mediado por receptores ER. Los estrógenos

podrían estar implicados en los mecanismos de regeneración del epitelio de los túbulos renales.

115 (377) EFECTOS DE LA INHIBICION DEL ESTRES OXIDATIVO CON TEMPOL SOBRE EL BALANCE HIDROSALINO EN RATAS CON SOBRECARGA AGUDA DE SODIO

Marcelo Roberto Choi[123]; Nicolás Martín Kouyoumdzian[13]; Natalia Lucía Rukavina Mikusic[13]; Elsa Zotta[4]; Marcela Pandolfo[3]; Silvana Lorena Della Penna[3]; Belisario Enrique Fernández[13]; Jorge Eduardo Toblli[1]; María Inés Rosón[13]
ININCA, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA[1] Cátedra de Anatomía e Histología[2] INFIBIOC[3] Cátedra de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA[4]

El radical superóxido es un mediador clave en el mecanismo dipsógeno y en la reabsorción tubular de sodio. El tempol, mimético de la superóxido dismutasa, metaboliza al anión superóxido y aumenta la expresión de eNOS. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto del tempol sobre el balance hidrosalino en ratas con sobrecarga aguda de sodio. Ratas Sprague Dawley (n=6-8/grupo) se les inyectó solución isotónica (C) o hipertónica (Na): NaCl 0.8M, 2ml/100gr por vía ip; con (c/B) y sin (s/B) acceso al agua de bebida, y con (c/T) y sin tempol (100 mg/Kg ip); Durante 90 minutos se midió función renal, ingesta de agua y concentración plasmática de sodio y proteínas. Se determinó la expresión renal de AQP1 y eNOS y localización de AQP2 en médula renal. La natremia y proteinemia se incrementaron en el grupo Na s/B y en los grupos Na con tempol (c/B y s/B) ($p<0.01$). El grupo Na c/B tuvo menor diuresis y natriuresis que el grupo Na s/B. El tempol incrementó la diuresis, natriuresis y excreción fraccional de sodio solamente en el grupo Na c/B c/T vs Na c/B ($p<0,05$). El tempol inhibió la ingesta de agua en el grupo Na c/B c/T respecto del grupo Na c/B ($p<0,05$). En el grupo Na c/B aumentó la expresión de AQP1 (C c/B: 1,10±0,07 vs Na c/B:2,18±0,12, $p<0,05$) y eNOS (C c/B: 1,01±0,07 vs Na c/B: 2,04±0,09) en corteza renal. El tempol incrementó la expresión de AQP1 y eNOS en corteza renal, en los grupos C c/B c/T (AQP1, 5.07±0,07; eNOS, 4,63) y Na c/B c/T (AQP1, 5.54±0,11; eNOS, 4,62) vs sus respectivos grupos sin tempol. El tempol incrementó la localización de AQP2 en membrana plasmática de túbulos colectores medulares en el grupo Na c/B c/T ($p<0,05$). El tempol facilita la diuresis y natriuresis en ratas con sobrecarga aguda de sodio, asociada a una mayor expresión de eNOS. Sin embargo, incrementa la hipernatremia al inhibir el mecanismo de la sed, a pesar de incrementar la AQP1 en corteza y la localización de AQP2 en túbulo colector medular.

116 (467) EFECTO DEL COMPLEMENTO CROMOSOMICO SEXUAL SOBRE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES ANGIOTESINERGICOS A NIVEL RENAL

Florencia Dadam[1]; María Julia Cambiasso[13]; Laura Vivas[12]; Ximena Caeiro[1]
IMMF-INIMEC-CONICET-UNC[1] Fac. De Cs. Exactas - Univ. Nac. de Cordoba[2] Fac. Odontología - Univ. Nac. De Cordoba[3]

Evidencias previas demuestran un efecto activador de los esteroides gonadales sobre la expresión dimórfica sexual de receptores angiotensinérgicos AT1/AT2 a nivel renal. Si bien no se puede negar el rol indiscutible de los esteroides gonadales en el dimorfismo sexual, una serie de estudios indican que algunas características sexualmente dimórficas no pueden ser explicadas en su totalidad por la acción de las hormonas esteroideas gonadales. Teniendo en cuenta estudios propios que sugieren que el complemento cromosómico sexual (CCS) modula no sólo la expresión de los receptores angiostensinérgicos a nivel central sino también la respuesta dimórfica sexual bradicárdica barorefleja, nos propusimos evaluar si el CCS modula diferencialmente la expresión del ARNm de los receptores para Angiotensina II y Angiotensina (1-7) a nivel renal. Para este propósito empleamos una cepa de ratón transgénico que permite deslindar los efectos de los factores: a) hormonal (comparando machos versus hembras), b) del CCS, comparando XY-hembras vs. XX-hembras y XY-machos vs. XX-machos, c) así como de la interacción de ambos factores. Se emplearon ratones de 55 días de edad de los cuatro genotipos que fueran gonadectomizados con 15 días de antelación. La corteza y médula renal fueron disecadas y se evaluaron por PCR en tiempo real los niveles de ARNm de los receptores AT1, AT2 y Mas. El análisis estadístico de los datos demostró que, independientemente del estatus gonadal, el CCS modula los niveles del ARNm del receptor AT1 a nivel de la corteza renal, siendo su expresión mayor en ratones con CCS-XY vs. aquellos con CCS-XX {$F(1,7)=10,90$, $p<0.01$}. Sin embargo, no se evidenciaron diferencias en la expresión de los receptores AT2 y Mas. Por su parte, a nivel de la medula renal no se observaron diferencias significativas atribuibles a los factores fenotipo, CCS ni a la interacción de los factores para ninguno de los receptores angiotensinérgicos analizados. Subsidiado por: ANPCyT, ISN, SECyT, Mincyt-Cba y CONICET.

117 (470) CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DE SUBUNIDAD α DE LA NA+K+ATPASA ASOCIADOS A LA SENESCENCIA

María Constanza Potilinski; Rosalía Moretta; Eduardo García Gras; Carlos Amorena
CESYMA-UNSAM

Durante la senescencia se observa un decrecimiento en la función renal y un incremento en la susceptibilidad de desarrollar enfermedades renales. Como resultado, se observa una reducción en la tasa de filtrado glomerular y una disminución de la capacidad de concentración urinaria. La Na+K+ATPasa promueve las condiciones energéticamente favorables para el transporte de Na+ en los túbulos proximales de la corteza renal, dónde la mayor parte de la carga de Na+ filtrada es activamente reabsorbida junto con el agua. La subunidad α es el dominio catalítico de la Na+K+ATPasa. Existen tres isoformas de la subunidad α con diferente distribución relativa y sujetas a la regulación temporal. El objetivo de este trabajo es determinar si cambios en los patrones de distribución relativa de esta subunidad podrían estar relacionados con el decrecimiento de la función renal durante la senescencia. Para ello se utilizaron ratas Wistar macho jóvenes (3 meses, N=6) y ratas Wistar macho senescentes (20 meses, N=6). Determinamos la expresión total de la subunidad α en muestras de corteza y médula renal. Se realizó la cuantificación del ARNm por la técnica de RT-PCR y los niveles de proteína por Western Blot para esta subunidad en ambos grupos experimentales. A su vez, se realizó la cuantificación específica del ARNm de las subunidades α1 y α2 en muestras de corteza renal. Como resultado observamos un decrecimiento en la subunidad α total en las muestras de corteza renal de los animales senescentes tanto a nivel del mensajero como a nivel proteico. Para la subunidad α1 se observó un decrecimiento en las muestras de corteza renal de los animales senescentes, sin embargo, no se observaron cambios en la expresión del mensajero de α2. Estos resultados en conjunto nos estarían indicando que un cambio en la expresión de las isoformas predominantes podría afectar el funcionamiento de la Na+K+ATPasa contribuyendo así al decrecimiento en la reserva funcional renal.

118 (595) NEFROPATÍA DIABÉTICA Y SU PRGRESIÓN A LA CRONICIDAD

Erika Abril Seyahian[1]; Santiago Melendi[1]; Leandro Cacciagiu[3]; Felipe Jové[1]; Rosario Musacco Sebio[4]; Christian Saporito Magriñá[4]; Marisa G Repetto[4]; Alicia Araoz[1]; Mauricio Castro Parodi[5]; Alicia E Damiano[5]; Federico Ochoa[1]; Néstor Lago[2]; Elsa Zotta[1]
Sección Patología. IFIBIO-Houssay-Conicet. FMED. UBA.[1] CEPEA. FMED. UBA.[2] Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis. Dpto de Bioquímica Clínica. FFyB. INFIBIOC-UBA.[3] Cátedra de Química General e Inorgánica. FFyB. UBA.[4] Laboratorio de Biología de la Reproducción. IFIBIO-Houssay-Conicet. FMED. UBA.[5]

La Enfermedad Renal Crónica (ERC) es una patología de alta prevalencia que afecta a más del 17% de los individuos mayores de 20 años alrededor del mundo.Una de las principales causas de ERC en Argentina y occidente es la diabetes mellitus (DM).

Desarrollamos un modelo de DM Tipo I en ratas Sprague Dawley. Se realizaron estudios preliminares a los 15 días, 45 días y a los 3 meses post inoculación para determinar la progresión de las alteraciones estructurales y bioquímicas en el tiempo y su relación durante la evolución de la lesión renal a la cronicidad. El Clearance de Creatinina (Ccr) no mostró alteraciones significativas a los 15 días post-inoculación, disminuyó a los 45 días y aumentó a los 3 meses de evolución de la patología. Se evaluó el daño renal utilizando estudios histológicos (técnicas de PAS y Tricrómico) e histológico ultra estructural (por Microscopía Electrónica de Transmisión). Tres meses luego de la inoculación observamos el desarrollo de lesiones nodulares de Kimmelstein Wilson características de DM. Por Microscopía electrónica se estudiaron las características de las células, procurando evaluar cambios en la morfología mitocondrial que se pudieran asociar con un deficiente funcionamiento de las mismas. Se realizaron técnicas para estudios de muerte celular como la expresión de Klotho, una proteína recientemente descubierta como antiapoptótica y TUNEL. Aunque son muy numerosos los estudios que demuestran que la muerte celular juega un papel relevante en la etiología de muchas enfermedades, parece evidente que futuros estudios deberán estar encaminados tanto a documentar nuevas asociaciones entre ésta y la enfermedad renal, como a desarrollar nuevas terapias que mejoren tanto la sobrevida como la calidad de vida de los pacientes.

119 (599) PARTICIPACIÓN DE LA ACUAPORINA 2 (AQP2) Y DEL INTERCAMBIADOR NA+/H+ 1 (NHE1) EN LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS RENALES

Nuevo, María Jimena; Mendivil, Tomás; Pizzoni Alejandro; Rivarola, Valeria; Ford, Paula; Capurro, Claudia; Di Giusto, Gisela

Laboratorio de Biomembranas IFIBIO-HOUSSAY, FMED, UBA.

Una característica común de las células migrantes es su polarización dentro del plano de movimiento generando dos zonas diferentes: lamelipodio y cuerpo celular. Nuestros resultados preliminares mostraron que la AQP2 participa del proceso de migración de células renales. En este trabajo nos proponemos investigar la posible asociación entre la AQP2 y el NHE1, transportador involucrado en los flujos iónicos localizados en el lamelipodio y en la adquisición de la polarización celular. Como modelo experimental utilizamos dos líneas celulares de túbulo colector cortical: WT-RCCD1 que no expresa AQPs y AQP2-RCCD1 que expresa constitutivamente AQP2 en la membrana apical. Corroboramos la participación de la AQP2 en la migración realizando el clásico ensayo de cicatrización de herida en presencia o no de HgCl2 (100 uM) y midiendo el% de cicatrización de la monocapa a las 4 hs. Los resultados mostraron que las células AQP2 disminuyeron su capacidad migratoria en presencia del inhibidor de AQPs (C: 35 ± 2% vs. HgCl2: 28 ± 3%*, n=22, *p<0,05). Realizamos la determinación del volumen del lamelipodio por inmunofluorescencia. Los resultados mostraron que los lamelipodios de las células WT migrantes poseen un mayor volumen (723 ± 94um3) que los de las células AQP2 (499 ± 47um3) (n=50, p<0,05). Cuando evaluamos la participación del intercambiador NHE1, utilizando el inhibidor HOE-694 1 uM, observamos que las células AQP2 disminuyeron el% de cicatrización (C: 32 ± 1% vs. HOE: 24 ± 1%*, n=5, *p<0,01). Al observar mediante inmunofluorescencia estas células AQP2 migrantes en presencia de HOE, notamos una disminución del 28 ± 1% (n=32) en la formación de los lamelipodios, resaltando la importancia del NHE1 como organizador de la polarización celular. En base a los resultados proponemos una coordinada participación de la AQP2 y del NHE1 en los cambios rápidos y localizados del volumen del lamelipodio lo que resultaría clave para el favorecimiento del proceso de migración celular.

120 (613) ROL DE LA ISOFORMA 1 DEL INTERCAMBIADOR SODIO/PROTÓN (NHE1) EN EL CRECIMIENTO EN MEDIO ÁCIDO DE CÉLULAS RENALES QUE EXPRESAN AQP2

Christensen, María José; Di Giusto, Gisela; Ford, Paula; Capurro, Claudia; Rivarola, Valeria

Laboratorio de Biomembranas. IFIBIO Houssay

De la asociación entre los mecanismos de proliferación y el pHi surge la posibilidad que una alteración crónica del pH los modifique dado que el control del pH intracelular (pHi), regulado en parte por los intercambiadores Na+/H+ (NHE), es necesario para una correcta modulación de los procesos de proliferación. Previamente mostramos en células renales que la expresión del canal de agua acuaporina 2 (AQP2) induce una disminución de la proliferación asociada al NHE1. El objetivo de este trabajo fue investigar si la exposición a medio ácido de las células renales alteraba su crecimiento. Para ello se utilizaron dos líneas celulares de túbulo colector cortical: WT-RCCD1, la cual no expresa AQPs, y AQP2-RCCD1 que expresa constitutivamente AQP2 en la membrana apical. Se realizaron estudios de proliferación, inmunofluorescencia e inmunoblot. Nuestros estudios muestran que luego de 24hs de exposición a medio ácido (ΔpH=0.4) las células que expresan AQP2 aumentan significativamente su proliferación (%=12.1±4.7, p<0.05 n=26) mientras que en las células WT se inhibe el crecimiento (%=-20.2±6.8, p<0.01 n=26). Este resultado se repite si se aumenta el gradiente hasta 0.7 unidades de pH. A mayores diferencias de pH ambas líneas disminuyen su crecimiento. Al inhibir el NHE1 durante el crecimiento en acidosis se observó que NHE1 no ejercía más un efecto antiproliferativo en las células que expresan AQP2. Por otra parte nuestros estudios mostraron que, si bien la expresión total de NHE1 no cambiaba en presencia de medio ácido, la localización cambiaba drásticamente hacia la membrana plasmática solo en las células que expresan AQP2. Nuestra hipótesis es que este cambio de localización de la NHE1 durante la exposición a medio ácido modifica su regulación eliminando el efecto antiproliferativo que ejerce en las células con AQP2. Esto podría explicar el efecto proliferativo de la acidosis en línea AQP2-RCCD1.

121 (625) CARACTERIZACIÓN DE LA APOPTOSIS EN UN MODELO ANIMAL DE SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO.

Santiago Ezequiel Melendi[1]; Federico Ochoa[1]; Abril Seyahian[1]; Felipe Jove[1]; Alicia Araoz[1]; Nestor Lago[2]; Elsa Zotta[1]

IFIBIO Houssay UBA-CONICET, Fac. de Medicina, UBA[1]
Centro de Patología Experimental y Aplicada, Departamento de Patología, Fac. de Medicina, UBA[2]

En la Argentina, el SUH constituye la causa más frecuente de insuficiencia renal aguda en niños, el 30% permanece con alteración de la función renal. Es producido por la infección con Escherichia coli productor de toxina Shiga tipo 2 (Stx2). El objetivo de nuestro trabajo fue caracterizar el desarrollo de apoptosis, en un modelo experimental de SUH en ratas. Ratas Sprague-Dawley (150-200 g) fueron inyectadas por vía intraperitoneal. El grupo experimental fue inoculado con sobrenadante de cultivo bacteriano de E-coli recombinante que expresa Stx2 (sStx2). Se inoculo 3 mL/ 200 g de peso (dosis letal) y 0.25 mL/ 200 g de peso (dosis subletal). El grupo control se inoculó con el mismo volumen de sobrenadante de cultivo bacteriano de E-coli recombinante que no expresa Stx2 (sControl) En todos los grupos se realizaron estudios funcionales, histológicos, inmunofluorescencia para BAX y Bcl-2, inmunotipificación de Klotho y detección de apoptosis por fragmentación de ADN (TUNEL), a distintos tiempos de evolución. Los estudios funcionales mostraron una disminución del filtrado glomerular a la semana e hiperfiltración a los tres meses. A este tiempo, los animales presentaron microalbuminuria, proteinuria, e histológicamente una glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFS) y desarrollo de fibrosis túbulo intersticial. La inmunofluorescencia para BAX y Bcl-2 muestra variaciones significativas de su expresión en corteza y medula renal en los grupos experimentales respecto del control, La inmunotipificación de Klotho en tejido renal muestra acentuada disminución en los distintos tiempos de evolución luego de la inoculación de Stx2. Estos resultados se correlacionan con el aumento en la apoptosis inducido por Stx2 evidenciable por la técnica de TUNEL Nuestros resultados muestran que tanto en la lesión aguda como en la evolución a la cronicidad, la apoptosis forma parte de los

mecanismos fisiopatológicos que conducen al daño renal en la nefropatía del SUH.

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES 2

123 (33) WNT5A PROMUEVE LA ACTIVACIÓN DE NF-KB Y AKT EN MELANOMA

Gastón Alexis Barbero[123]; María Agustina Del Grosso[12]; María Victoria Castro[12]; María Belén Villanueva[123]; Ivonne Muñoz Contreras[12]; Pablo Roberto Lopez Bergami[123]
Universidad Maimonides[1] Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnóstico (CEBBAD)[2] Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - CONICET[3]

Melanoma es la forma más agresiva del cáncer de piel y es el responsable de más del 60% de las muertes producidas por cáncer de piel. Wnt5a es una glicoproteína de secreción involucrada en la vía de señalización no canónica de Wnt y juega un papel importante en melanoma incrementando la motilidad, invasión, proliferación y resistencia a apoptosis. Uno de los blancos de Wnt5a es Akt, una quinasa de serina/treonina clave en la vía de PI3K, que asegura la trascripción de genes involucrados en proliferación y supervivencia celular. Sin embargo, se sospecha que muchas otras vías de señalización aún no identificadas mediarían estos y otros efectos de Wnt5a sobre las células de melanoma. Muchos tumores sólidos incluyendo melanoma, muestras elevados niveles y/o elevada actividad trascripcional de NF-kB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). Este complejo, formado por el dímero p65/p50, luego de ser activado por fosforilación trasloca al núcleo y regula la trascripción de más de 150 genes blancos involucrados en supervivencia celular, favoreciendo así la tumorgenicidad de la célula. El objetivo del presente trabajo es estudiar la existencia de una posible vinculación entre Wnt5a y la activación de las vías de señalización de Akt y NF-kB en líneas celulares de melanoma. Células MeWo fueron estimuladas por distintos tiempos con Wnt5a para establecer la cinética de activación de Akt y p65, determinando sus niveles de fosforilación mediante Western Blot. Este experimento demostró un marcado aumento en la fosforilación de Akt y p65 luego de entre 30 y 60 minutos de estimulación con Wnt5a. Luego, estimulamos 10 líneas celulares correspondientes a melanoma primario y metastásico con Wnt5a durante 60 minutos para establecer con qué frecuencia estas vías de señalización eran activadas por este ligando. Se pudo observar que Akt es activada por Wnt5a en 8 líneas celulares. Cuatro de estas 8 líneas presentan a su vez fosforilación de p65 en respuesta a Wnt5a. Interesantemente, las dos líneas celulares en las cuales Wnt5a no activó la fosforilación de Akt, mostraron una inhibición de la fosforilación basal de p65 ante el tratamiento por Wnt5a. Experimentos realizados con células transducidas establemente con Akt-Myr (una variante miristoilada y, consiguientemente activa, de Akt) y con el inhibidor de PI3K LY294002, permitieron establecer que Akt está directamente involucrada en la fosforilación de p65. Además, se determinó que la fosforilación de p65 por Wnt5a es dependiente de Dvl pero independiente de IkBa. Finalmente determinamos que la estimulación de células de melanoma con Wnt5a no se limita a fosforilar p65 sino que también produce la activación de la vía de señalización NF-kB al observar mediante western blot cambios en la expresión de conocidos genes blancos de esta vía luego de 8, 18 y 36 horas de estimulación con Wnt5a. Estos experimentos revelaron que Wnt5a induce un aumento en los niveles de N-cadherina, RelB, p53, Bcl2, Mcl1, ciclina D y Bax. Estos resultados demuestran por primera vez que el ligando Wnt5a activa la vía de señalización de NF-kB en melanoma a través de mecanismos dependientes e independientes de Akt.

124 (48) LA SUMOILACIÓN DE FKBP51 MODULA SU ACTIVIDAD, MEDIADA POR HSP90, COMO COCHAPERONA DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES

Maia Ludmila Budziñski[1]; María Antunica Noguerol[12]; Romina Gobbini[1]; Clara Sokn[1]; Sergio Senin[1]; Nils Gassen[3]; Theo Rein[3]; Ana Clara Liberman[1]; Eduardo Arzt[12]
IBioBA-CONICET-MPSP[1] FBMC, FCEN, UBA.[2] Instituto Max Planck de Psiquiatría, Munich, Alemania.[3]

FK-506 binding protein (FKBP) 51 es una co-chaperona que regula la actividad del receptor de glucocorticoides (GR), mediador clave en la respuesta a estrés. Alteraciones en su funcionalidad están asociadas al desarrollo de desórdenes psiquiátricos e inmunes. Sin embargo, aún no se han descripto modificaciones post-traduccionales sobre FKBP51 que modulen su actividad. La sumoilación consiste en la adición covalente del péptido SUMO y juega un rol clave en estrés. Por esta razón, estudiamos a FKBP51 como blanco de sumoilación y su impacto sobre la actividad del GR en el contexto neuronal. Previamente demostramos que FKBP51 es sumoilado mediante ensayos de sumoilación in vitro e in vivo y evaluamos el efecto de la sumoilación de FKBP51 sobre la actividad del GR. A continuación, analizamos si FKBP51 endógeno es blanco de sumoilación y la influencia de PIAS4 (enzima E3 ligasa) y distintos tipos de estrés celular (shock térmico e hipoxia) sobre la sumoilación y la actividad del mismo. Observamos mediante ensayos de purificación por afinidad a resinas de niquel que FKBP51 endógeno es sumoilado y que al inhibir la expresión de PIAS4 se inhibe la sumoilación endógena y también se pierde el efecto inhibitorio de FKBP51 sobre la actividad del GR, asi como interacción de FKBP51 endógeno con Hsp90. Demostramos mediante ensayos de western blot que en condiciones de estrés celular como shock térmico e hipoxia, aumenta la sumoilación de FKBP51 aumentando su efecto inhibitorio sobre la actividad transcripcional del GR ($p<0.05$). Además, observamos que en shock térmico aumenta la sumoilación de PIAS4 lo cual modula su actividad como E3 ligasa, pudiendo ser éste un posible mecanismo por el cual en dicha condición aumenta el efecto inhibitorio de FKBP51 sobre la actividad del GR. Nuestros hallazgos atribuyen una nueva función a PIAS4 dentro del sistema regulatorio de la actividad del GR y lo convierten en un blanco interesante con potencial terapéutico para el tratamiento de desórdenes asociados. Apoyado por ANPCyT, CONICET, UBA y FOCEM (COF 03/11).

125 (60) MECANISMO DE REGULACIÓN DEL PH EXTRACELULAR POR EL CANAL DE CLORURO CFTR

Cancio, Carla Estefanía; Mori, Consuelo; Massip Copiz, María Macarena; Clauzure, Mariángeles; Valdivieso, Ángel Gabriel; Santa Coloma, Tomás Antonio
BIOMED; Pont. Univ. Cat. Arg. "Sta. María de Los Bs. As".

La Fibrosis Quística (FQ) es causada por mutaciones en el gen CFTR, que codifica un canal de Cl^- y $HCO3^-$ activado por AMPc. Se ha propuesto que la falla de la función del CFTR como transportador de HCO3- induce una disminución del pH extracelular (pHe). Anteriormente, reportamos que la reducción de la actividad del Complejo I mitocondrial (CIm) en FQ está mediada por un efecto autocrino de interleuquina-1 beta (IL-1β). Esta falla en el CIm podría afectar la producción de lactato por efecto Warburg. Proponemos como hipótesis que el pHe estaría disminuido por una combinación entre el menor transporte de $HCO3^-$ y el aumento en la producción de ácido láctico. Nuestro objetivo fue demostrar esta hipótesis y estudiar los mecanismos de regulación del pHe mediados por CFTR. Como modelo se utilizaron células Caco-2 (CFTR salvaje) transfectadas con un plásmido de ARN de interferencia contra el CFTR (shRNAi, Caco-pRS26) y con un plásmido control (Caco-pRS30003). Las células Caco-pRS26 mostraron una reducción significativa del pHe con respecto a las células controles. El tratamiento de las células Caco-pRS30003 (CFTR salvaje) con IL-1β exógena produjo una reducción significativa del pHe. El bloqueo de la señalización de IL-1β con el antagonista ILRN1 en células Caco-pRS26 rescató parcialmente el pHe, lo que sugiere un efecto autocrino de dicha citoquina. Luego se estudiaron diferentes vías de señalización de IL-1β. La inhibición de c-Src (PP2) y de JNK (SP600125), aumentó significativamente el pHe en ambas líneas celulares. El tratamiento con oxamato, un inhibidor de la lactato deshidrogenasa, rescató el pHe en las células Caco-pRS26 comparadas con las células controles. Estos datos sugieren que la producción

de ácido láctico, incrementada por la disminución de la actividad del CFTR, cumple un rol fundamental en la regulación del pHe. Agradecimientos: CONICET, PIP2012-2014-0685 y PICT2012-1278 de la ANPCYT. Beca Agencia (CEC), beca UCA (MC) y becas CONICET (CM, MMMC, MC).

126 (61) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA INTERLEUQUINA-1β EN FIBROSIS QUÍSTICA

Clauzure, Mariángeles; Massip Copiz, María Macarena; Cancio, Carla; Mori, Consuelo; Asensio, Cristian; Valdivieso, Ángel Gabriel; Santa Coloma, Tomas Antonio
BIOMED

La fibrosis quística (FQ) está caracterizada por una condición inflamatoria general con elevada concentración de citoquinas en esputo, incluyendo la citoquina proinflamatoria interleuquina-1β (IL-1β). Trabajos previos de este laboratorio demostraron que la expresión de IL-1β se encuentra aumentada cuando se afecta la actividad del CFTR, aumento que es independiente de la presencia de una infección. Asimismo, que la IL-1β está involucrada en la disminución de la actividad del Complejo I mitcondrial (mCx-I) mediante un efecto autocrino. Por otro lado, hubo una reducción muy importante de los niveles de ROS mitocondriales y una reducción total de los niveles de ROS citoplasmáticos con recuperación de la actividad del mCx-I en presencia de bloqueantes de IL-1β (Ab bloqueantes y IL1RN). Esto sugiere que el daño mitocondrial (ROS y mCx-I) en FQ es producido por dicho "loop" autócrino. El paso siguiente y objetivo general de este trabajo, fue determinar los efectos de la concentración de cloruro intracelular en la expresión de IL-1β. Para estudiar la posible modulación de la expresión del gen de IL-1β por la $[Cl^-]i$ (ya que la función principal del CFTR es modular los niveles de este anión), se utilizó la técnica de RT-PCR en tiempo real a partir de muestras de ARNm de células IB3-1 (línea celular proveniente de tráquea de paciente con FQ). Las células fueron previamente incubadas en presencia de diferentes concentraciones de Cl^- (0-140 mM). Los resultados obtenidos sugieren que efectivamente los niveles de Cl^- intracelular pueden modular la expresión de IL-1β independientemente de la presencia o ausencia del CFTR. De modo que Cl^- actuaría como segundo mensajero entre el CFTR y la regulación de la expresión de IL-1β. Agradecimientos: Subsidios CONICET (PIP 2012-2014, 0685), ANPCYT (PICT-2012, 1278) y UCA. Becas CONICET (MMMC, MC, CM), ANPCYT (CEC) y Banco Santander-Río (MC y CM).

127 (122) INTERACCIÓN DE BMP-4 Y ÁCIDO RETINOICO EN LA INHIBICIÓN DE LA FUNCIÓN DE LA CÉLULA CORTICOTRÓFIC

Leandro E. Nieto[1]; Maríana Fuertes[1]; Valeria G. Antico Arciuch[1]; Eduardo Arzt[1,2]
Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires - CONICET - MPSP[1] Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular, Fac. de Cs. Exactas y Naturales, UBA[2]

La Proteína morfogenética ósea 4 (BMP-4) es un factor de desarrollo, metabolismo y diferenciación celular que se encuentra presente en la hipófisis normal y estimula a la célula lactotrófica hipofisaria. Previamente demostramos que el tratamiento in vitro con BMP-4 de células corticotrofas tumorales AtT-20, disminuye la secreción de corticotrofina (ACTH) y la proliferación celular. Demostramos además que el Ácido Retinoico (AR), un metabolito de la Vitamina A que induce diferenciación y apoptosis en distintos tipos celulares, inhibe la proliferación, invasión y el crecimiento tumoral corticotrofo in vivo. Este trabajo busca elucidar la posible interacción entre las vías de señalización de BMP-4 y AR en la regulación del corticotrofo, y los mecanismos moleculares participantes. En la línea celular tumoral corticotrofa de ratón AtT-20, se determinó la expresión de receptores de AR mediante Western Blot, observando la presencia de receptores de tipo RARβ, RXRα, y RXRγ, utilizando la línea celular HeLa como control positivo de expresión de estos receptores. En células AtT-20 transfectadas con un vector conteniendo la secuencia promotora de Proopiomelanocortina (POMC) asociada a un gen reportero de Luciferasa, y luego estimulando con BMP-4, observamos la inhibición de POMC (59% 100 ng/mL; $p < 0.01$) en forma dosis dependiente (50-200 ng/mL), determinando que la acción de BMP-4 sobre ACTH se produce a nivel transcripcional. Esta inhibición de BMP-4 se observa estimulando el promotor con CRH (100 nM) o Forskolina (10 μM). La cotransfección con los inhibidores de la vía de señalización de Smads, Smad 6 y Smad 7, revierte esta acción. Demostramos que el AR (100 nM) también inhibe (42%; $p < 0.05$) transcripcionalmente a POMC. El cotratamiento de AR y BMP-4 presenta un efecto sinérgico. Tras el análisis in silico de la secuencia promotora de POMC, observamos que el mismo contiene un elemento de respuesta a AR (RARE), por lo cual analizamos el efecto de BMP-4 y AR sobre la actividad transcripcional del reportero RARE-Luc. Encontramos que BMP-4 amplifica el efecto estimulatorio de AR sobre RARE. Los resultados demuestran que ambos factores inhibitorios, BMP-4 y AR, actúan a nivel transcripcional sobre POMC, haciéndolo en forma sinérgica. La secuencia RARE del promotor de POMC estaría involucrada en esta regulación. El potencial uso terapéutico de estas sustancias sobre los tumores corticotropos se verá favorecida con la comprensión de los mecanismos involucrados. Apoyado por ANPCyT, CONICET, UBA y FOCEM (COF 03/11).

128 (127) ROL DIFERENCIAL DE ERK 1/2 MAPK Y P38 MAPK EN LA RESPUESTA DE LAS CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE COLON HUMANO ESTIMULADAS CON EL ANÁLOGO TUMORAL DE LA HORMONA PARATIROIDEA

Calvo, Natalia G; Carriere, Pedro; Martín, María Julia; Gentili, Claudia
INBIOSUR

El análogo tumoral de la hormona paratiroidea (PTHrP) está implicado en varios tumores como el carcinoma de colon. La patogénesis de esta enfermedad involucra varios procesos, incluyendo la supervivencia celular, la proliferación, la migración y la angiogénesis. Previamente demostramos que, en las células Caco-2 derivadas de adenocarcinoma de colon humano, el tratamiento con PTHrP exógeno (10-8 M) incrementa la migración mediante ERK 1/2 MAPK. En el presente trabajo se estudiaron los mecanismos moleculares que modulan la migración inducida por PTHrP en estas células intestinales tumorales. Mediante el ensayo de cierre de la "herida" se evidenció que p38 MAPK no participa en el aumento en la capacidad de migrar inducido por PTHrP. La hormona induce la fosforilación mediante ERK 1/2 de la serina/treonina quinasa S6 ribosomal (RSK), una enzima implicada en la migración, la invasión y la metástasis tanto in vitro como in vivo. Sin embargo, mediante el uso de un inhibidor específico, se observó que p38 MAPK no revierte la fosforilación de RSK inducida por PTHrP. Mediante la realización de una "herida" en la monocapa celular seguido del análisis de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-fosfotirosina y anti-actina, se observó además la presencia de numerosas pequeñas estructuras, presumiblemente correspondientes a las adhesiones focales asociadas con filamentos de actina en las células tratadas con PTHrP por 24 horas. Análisis por Western blot revelan que PTHrP aumenta la expresión proteica de la quinasa de adhesión focal (FAK), que está involucrada en procesos de migración celular regulando principalmente la señalización relacionada con la adhesión celular a la matriz extracelular. Más aun, se evidenció que estos cambios de la expresión son dependientes de ERK 1/2 MAPK pero independientes de p38 MAPK. En conclusión, nuestros resultados revelan un rol diferencial de ERK 1/2 MAPK y p38 MAPK en la respuesta de las células Caco-2 estimuladas con PTHrP.

129 (173) LA PROTEÍNA DE EXPRESIÓN ESPECÍFICA TUMORAL MAGEB2 COMO REGULADOR DE LAS VÍAS DE CONTROL DE LA BIOGÉNESIS RIBOSOMAL

Fatima Ladelfa[1,2]; Leticia Peche[3]; Julieta Laiseca[1,2]; Franco Pascucci[1]; Martin Monte[1,2]
Laboratorio de Oncología Molecular, Dpto Qca Biologica FCEYN, UBA.[1] IQUIBICEN, CONICET[2] LNCIB, Trieste, Italia[3]

MageB2 es una proteína de expresión específica tumoral perteneciente a la familia MAGE. Previamente demostramos que su expresión confiere ventajas proliferativas in vitro e in vivo. MageB2 presenta localización nucleolar, regula la biogénesis ribosomal y bajo condiciones de estrés interfiere con uno de los principales checkpoints nucleolares: la activación de proteínas ribosomales. Aquí estudiamos los efectos de la expresión de MageB2 sobre dos de las principales vías que regulan la biogénesis ribosomal: las vías oncogénicas de c-myc y PI3K/AKT. Mediante Western Blot observamos que los niveles endógenos de c-myc son mayores en presencia de MageB2. Además, mediante RT-qPCR observamos que los niveles de precursor del RNA ribosomal (pre-rRNA) aumentan en condiciones de sobreexpresión (SE) conjunta de c-myc y MageB2 (3,5 y 2 veces en relación a la SE única de c-myc o MageB2, respectivamente). Por otra parte, observamos que en condiciones de SE de c-myc, ΔNoLS-MageB2 (mutante de localización nuclear), se ve relocalizado en el nucléolo. Estos resultados sugieren que existiría conexión entre c-myc y MageB2 en la regulación de la biogénesis ribosomal donde c-myc estimula la localización nucleolar de MageB2 y MageB2 estabiliza y potencia la función de c-myc en la transcripción de pre-RNA. En relación con la vía de señalización de PI3K/AKT observamos que, en fibroblastos humanos normales Wi38 modificados para la expresión estable de MageB2, AKT permanece activado (fosforilado) en condiciones de bajo suero (0,1% suero) a diferencia de lo observado en las células control, en las cuales los niveles de p-AKT son nulos. Estos resultados sugieren que MageB2 mantendría activa la vía de AKT aún en ausencia de estímulos proliferativos. En conjunto, nuestros resultados sugieren que MageB2 regularía las principales vías de control de la biogénesis ribosomal y proliferación celular, explicando, al menos en parte, las bases de su potencial oncogénico.

130 (176) RELACIÓN ENTRE EL CANAL EPITELIAL DE SODIO (ENAC) Y EL CANAL REGULADOR DE LA FIBROSIS QUÍS- TICA (CFTR), Y LA PROTEÍNA XSHROOM1

Palma, Alejandra; Marino, Gabriela; Galizia, Luciano; Kotsias, Basilio
Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari

xShroom1 es una proteína endógena de ovocitos de Xenopus laevis asociada al citoesqueleto que regula a ENaC a través del número de canales en la membrana. Por otro lado ENaC y el canal de cloruro CFTR se coexpresan en numerosos epitelios con una interacción entre ambos dependiendo del tejido en donde se encuentran. Nuestro objetivo fue estudiar si la activación del CFTR afecta la actividad del ENaC, y la relación de ambos canales con xShroom1, midiendo las corrientes con pulsos de -140 a +60 mV y expresando los datos con el pulso de -100 mV. Examinamos si xShroom1 produce un efecto sobre las corrientes de CFTR. En ovocitos coinyectados con CFTR y oligonucleótidos antisentido contra xShroom1, se observó un aumento de la corriente de CFTR (-0.95 ± 0.52 μA, n=8) respecto a los ovocitos controles coinyectados con el sense de xShroom1 (-0.19 ± 0.12 μA, n=10, $p<0.01$). Observamos que las corrientes sensibles a amiloride, INa(amil), en ovocitos coinyectados con ENaC y CFTR fueron menores cuando activamos el canal CFTR con forskolina e IBMX: -1.33 ± 0.54 μA vs -0.69 ± 0.52 μA, n=6, $p<0.01$. En ovocitos coinyectados con ambos canales y oligonucleótidos antisentido contra xShroom1 las INa(amil) fueron menores (-0.52 ± 0.03 μA, n=3) respecto a los ovocitos controles coinyectados con el sense de xShroom1 (-1.56 ± 0.47 μA, n=4, $p<0.05$), y la activación del CFTR produjo que las INa(amil) disminuyan aún más (-0.16 ± 0.07 μA, n=3, $p<0.05$). La inhibición por CFTR fue mayor en ovocitos coinyectados con oligonucleótidos antisentido (70%) respecto a los coinyectados con los sense de xShroom1 (54%). Concluimos que xShroom1 regula al CFTR en forma inversa al ENaC demostrando que la función del ENaC no solo es por estímulos hormonales y de proteasas sino que su funcionamiento depende también de la activación del CFTR tal como ocurre con la relación complementaria que tiene con la P glicoproteína y que además de su función como canal iónico es un regulador clave de otras proteínas de membrana

131 (188) ROL DE LA TIROSINA QUINASA C-SRC EN FIBROSIS QUÍSTICA. PARTICIPACIÓN DE LA IL-1β

Massip Copiz, María Macarena; Valdivieso, Ángel Gabriel; Clauzure, Mariángeles; Cancio, Carla Estefanía; Mori, Consuelo; Asensio, Cristian; Santa Coloma, Tomás Antonio
BIOMED; Pont. Univ. Cat. Arg."Sta. María de los Bs. As."

La Fibrosis Quística (FQ) es una de las enfermedades hereditarias autosómicas recesivas más frecuentes, causada por mutaciones en el canal de cloruro CFTR. Anteriormente encontramos que la expresión y activación de c-Src estaba aumentada en diferentes modelos celulares de FQ. Teniendo en cuenta que en FQ se encuentra elevada la concentración de interleuquina-1β (IL-1β) y que nuestro laboratorio ha demostrado que a dosis altas la IL-1β inhibe la expresión del ARNm del CFTR, los objetivos de este trabajo fueron estudiar el rol de la IL-1β endógena en la activación de c-Src y evaluar la participación de c-Src en diferentes parámetros celulares alterados en FQ. Se utilizaron dos modelos: células IB3-1 (derivadas de un paciente con FQ) y S9 (IB3-1 corregidas que expresan CFTR wt) y células CaCo-2, que expresan CFTR wt, transfectadas con un plásmido shARN específico de CFTR (CaCo-2/pRS26) o con su plásmido control (CaCo-2/pRSctrl). Utilizando diferentes estrategias de bloqueo de la IL-1β, se observó mediante WB una disminución diferencial de la actividad de c-Src en células con fenotipo FQ (CaCo-2/pRS26) comparadas con las células control (CaCo-2/pRSctrl). Paralelamente, se evaluó el rol de c-Src en diferentes variables celulares alteradas en FQ. Se observó que c-Src participa significativamente en el aumento de las especies reactivas de oxígeno, en la disminución del pH extracelular y, preliminarmente, en el aumento de la proliferación celular observado en los modelos FQ. En conclusión, la inhibición de la actividad o expresión del CFTR produce un incremento en la actividad de c-Src y este incremento ocurre por la estimulación de una señalización autócrina de IL-1β. El aumento de c-Src media así diferentes efectos celulares alterados en FQ. Agradecimientos: Subsidios ANPCYT (PICT-2012-1278), CONICET (PIP 2012-2014-0685) y UCA. Becas CONICET (MMMC, MC, CM) y ANPCYT (CEC).

132 (205) EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE POSIBLES GENES DE REFERENCIA PARA ESTUDIOS DE RT-QPCR EN MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATONES EN CRECIMIENTO QUE SOBREEXPRESAN HORMONA DE CRECIMIENTO

Piazza, Verónica Gabriela; Mc Callum, Gregorio Juan; Muia, Nadia Vanina; Turyn, Daniel; Miquet, Johanna Gabriela; Sotelo, Ana Isabel
IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Univ de Buenos Aires

La técnica de PCR cuantitativa precedida de transcripción reversa (RT-qPCR) es ampliamente utilizada para determinar los niveles de ARN mensajero. Dada su elevada sensibilidad y las diversas fuentes de variabilidad que pueden afectar los resultados es imprescindible una correcta normalización. De las estrategias disponibles, el uso de genes de referencia como control interno es la más utilizada. En los últimos años se han desarrollado algoritmos que permiten seleccionar genes de referencia y validar su uso para cada experimento. Cuando la variable en estudio es el desarrollo o el crecimiento se han reportado mayores dificultades en los trabajos de validación publicados. El objetivo de este trabajo fue validar genes de referencia para normalizar los niveles de expresión de genes blanco de la hormona de crecimiento (GH) en músculo esquelético de ratones que sobreexpresan GH y sus hermanos de camada normales durante el período de crecimiento (2, 4 y 9 semanas de vida). Se analizaron genes frecuentemente utilizados como control interno y otros ya validados para condiciones experimentales similares, pertenecientes a distintas clases funcionales para disminuir la posibilidad de corregulación. Se midieron los niveles de expresión de ACTB, B2M, GAPD, GSK3, HPRT1, RNA18S, RPL13A y YWHAZ con el método de cuantificación relativa (ΔΔCt). Los resultados se analizaron mediante los algoritmos geNorm, NormFinder, BestKeeper y el método de

comparación de ΔCt. Si bien estos algoritmos validarían el uso de RPL13A, YWHAZ y RNA18S o GSK3 para normalizar, sus niveles de expresión muestran una tendencia dependiente de la edad y/o el genotipo. Estos resultados revelan la importancia de la validación de genes para utilizarlos como control interno en estudios de RT-qPCR y la necesidad de evaluar los datos crudos antes del procesamiento con los algoritmos disponibles. Además, plantean la necesidad de reconsiderar otros métodos de normalización de los resultados.

133 (263) REGULACIÓN CRUZADA ENTRE RECEPTORES H1 Y H2 A HISTAMINA POR LIGANDOS AGONISTAS Y AGONISTAS INVERSOS

Antonela Diaz Nebreda[1]; Emiliana Echeverria[2]; Daniel Zappia[2]; Carlos Davio[2]; Natalia Fernandez[2]; Federico Monczor[2]; Carina Shayo[1]
IBYME-CONICET[1] ININFA[2]

Los receptores H1 y H2 a histamina (RH1 y RH2) son receptores acoplados a proteína G, que regulan la producción de IPs y de AMPc respectivamente. Se coexpresan en varios tejidos y regulan procesos fisiológicos y patológicos como alergia/inflamación, secreción gástrica, neuromodulación, proliferación y diferenciación celular. Previamente hemos descrito en células leucémicas U937 y en células CHO que sobreexpresan RH1 y RH2 que el tratamiento con sus agonistas (AGO) conduce a la desensibilización (DSS) cruzada de ambos receptores. El objetivo de este trabajo es profundizar el estudio de la DSS cruzada causada por AGO o AGO inversos de estos receptores. En células HEK293T transfectadas con RH1 y RH2 observamos que el estímulo con AGO H1 induce la DSS del RH2. Dado que la DSS homóloga de ambos receptores involucra la participación de GRK2, evaluamos que dominio de GRK2 participa en la DSS cruzada utilizando las mutantes GRK2K220R y GRK2D110A (sin actividad kinasa y RGS, respectivamente). El dominio kinasa resultó necesario para la DSS heteróloga. Por otro lado, evaluamos la capacidad de AGO H2 de interferir sobre la respuesta inflamatoria/antiinflamatoria de agonistas/agonistas inversos del RH1, respectivamente. Para ello, cotransfectamos células HEK293T con RH1, RH2 y un plásmido que codifica para luciferasa río abajo del promotor de IL6. En este sistema, se observó que el AGO H2 revirtió los efectos sobre la actividad del reportero inducidos por AGO y AGO inversos H1. Por último, determinamos en células U937 que ligandos AGO inversos del RH1 pueden, al igual que los AGO, causar una DSS cruzada de la respuesta del RH2. Estos resultados describen mecanismos involucrados en la regulación cruzada entre los RH1 y RH2 y muestran evidencias de la implicancia que dichos mecanismos poseen sobre la regulación de procesos fisiológicos/patológicos modulados por ligandos antihistamínicos, ampliamente utilizados en la clínica para combatir situaciones de tipo alérgico-inflamatorias.

134 (297) LA DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RAC3 FAVORECE LA ADIPOGÉNESIS A TRAVÉS DE UN AUMENTO DE AUTOFAGÍA

Lira, María Cecilia; Rosa, Francisco D; Panelo, Laura C; Fernández Larrosa, Pablo Nicolás; Costas, Mónica A; Rubio, María Fernanda
Lab.Biología Molecular y apoptosis IDIM

El coactivador RAC3 es reclutado por distintos factores de transcripción e incrementa su actividad transcripcional. En trabajos previos demostramos que la disminución en sus niveles de expresión favorece los procesos de autofagía y también la adipogénesis. Durante la adipogénesis hay un remodelamiento celular que requiere de autofagía. Por ello decidimos estudiar como afectan los niveles de RAC3 en la autofagía inducida durante la diferenciación adipocítica. Se utilizaron clones estables de la línea fibroblástica murina L929 que expresan un ARN de interferencia para RAC3 murino (siRNA) o el control que tiene los mismos nucleótidos colocados al azar. La diferenciación se indujo con: 0,1 µg/ml insulina, 1 µM dexametasona, 0,1 mM Indometacina y 0,5 mM 3-isobutil-1-metilxantina (DI3). Al estudiar la marcación de vesículas ácidas con monodansyl-cadaverina (MDC), observamos un incremento de la marcación tras 6 h de estímulo con DI3 tanto en las células control como las que expresan el siRNA (control 84%±17 vs siRNA 92%±14) sin diferencia significativa entre ambas. En condiciones basales (control 9%±13 vs siRNA 42%±11 p<0,001) y tras 1 h de inducción (control 23%±10 vs siRNA 87%±16 p<0,001), se observó que las células que expresan el siRNA poseen una marcación significativamente mayor para MDC. Estos resultados coinciden con lo observado por microscopía de fluorescencia para LC3II, proteína asociada a los autofagosomas mostrando un aumento del patrón granulado en células con bajo RAC3. Al estudiar los estímulos individuales observamos que solo el tratamiento con Insulina induce un aumento significativo en la marcación con MDC en las células control (9%±13 basal vs 43%±8 Insu p<0,01) pero no así en las células que expresan el siRNA-RAC3 (42%±11 basal vs 32%±9 Insu) A partir de estos resultados podríamos concluir que uno de los mecanismos por los cuales la disminución de RAC3 favorecería la adipogénesis sería por un aumento de la autofagía.

135 (306) ESTABLECIMIENTO DE LA POLARIDAD MIGRATORIA: IMPLICANCIA DEL CITOESQUELETO DE ACTINA EN LA LOCALIZACIÓN POLARIZADA DEL CENTROSOMA

Florencia Hidalgo[1]; Facundo Tonucci[1]; Evangelina Almada[1]; Anabela Ferretti[1]; Rodrigo Vena[2]; Cristian Favre[1]; M. Cecilia Larocca[1]
IFISE[1] IBR[2]

La generación de un fenotipo migratorio es central en procesos tan diversos como la diferenciación embrionaria y la metástasis tumoral. Un evento temprano es la generación de un eje anteroposterior Golgi (AG)-centrosoma (Ct)-núcleo (N). AKAP350 (A350) y CIP4 son proteínas de ensamblaje, que modulan la dinámica del citoesqueleto celular. Previamente demostramos que A350 recluta CIP4 al AG y al Ct, y que ambas proteínas participan en el establecimiento de la polaridad migratoria. Nuestro objetivo fue evaluar si el citoesqueleto de actina está implicado en ese mecanismo. Células con perdida en la expresión de A350 (A350KD) o de CIP4 (CIP4KD); o con deslocalización centrosomal de A350 (A350CTD) fueron pretratadas con la droga desectructurante de actina citocalasina D y luego sometidas a ensayos de "wound-healing". Analizamos la polaridad migratoria mediante microscopia confocal de inmunofluorescencia. Determinamos la distancia del centroide del N y del Ct al frente de migración, relativa a la distancia del centroide de la célula. Observamos que el pretratamiento con Citocalasina D (Cito+) normalizó la ubicación del Ct delante del N en las células con pérdida en la función de ambas proteínas. (Distancia(%): Cito-: control(C): N -17±3, Ct 2±10; A350KD: N -20±4, Ct -30±9*; A350CTD: N -21±3, Ct -20±9*; CIP4KD: N -25±2, Ct -36±7*; Cito+: C: N -23±5, Ct 2±10; A350KD: N -20±4, Ct 17±9#; A350CTD: N -18±4, Ct 10±6#; CIP4KD: N -25±2, Ct -8±8#.*p<0,05 respecto al C; #p<0,05 respecto al Cito-). En células A350CTD, pero no en CIP4KD, el pretratamiento con citocalasina D normalizó la polarización del AG y la eficiencia migratoria, indicando el rol causal de la afección de la localización anterior del Ct en la alteración de esos parámetros. Nuestros resultados sugieren que A350 y CIP4 facilitan la desestructuración del citoesqueleto de actina permitiendo la localización anterior del centrosoma. CIP4 participaría en mecanismos adicionales involucrados en la polarización del AG.

135b (384) LA PROTEÍNA EPAC1 PARTICIPA EN LA RESPUESTAβ-ADRENÉRGICA SOSTENIDA DEL MIOCARDIO

Diego Tomas Quiroga[1]; Matilde Said[12]; Leticia Vittone[12]; Cecilia Mundiña-Weilenmann[12]
Univ. Nac. de La Plata[1] Centro de Investigaciones Cardiovasculares. CONICET[2]

La estimulación ß-adrenérgica es el mecanismo más poderoso de regulación de la función del corazón como bomba. Clásicamente, los efectos de los agonistas ß se atribuían al aumento del

AMPc y activación de PKA, pero recientemente se identificó una familia de proteínas fijadoras de AMPc, las proteínas Epac1 y 2. Aún no existen inhibidores específicos de Epac, pero el uso de agonistas selectivos permitió establecer que la estimulación de Epac promueve su translocación a membrana, y desencadena la activación de Rap1 y de CaMKII como un elemento río abajo. Nuestro objetivo fue determinar en qué medida la vía de Epac contribuye a la respuesta contráctil temprana y sostenida de la estimulación ß-adrenérgica en el miocardio. Se trataron miocitos aislados y corazones perfundidos tipo Langendorff, con dosis submáximas del agente ß-adrenérgico, isoproterenol (Iso, 3-10nM) en presencia y ausencia de un inhibidor de Rap (GGTI, 10µM) o de CaMKII (KN-93, 3µM). En miocitos, el aumento temprano de contractilidad inducido por Iso (20min), no se modificó por GGTI o KN-93. Sin embargo, éstos provocaron una caída del efecto inotrópico positivo del Iso a los 200min (acortamiento sarcomérico, expresado como% longitud inicial: Iso+GGTI:7,5±0,9% n=9 vs Iso:13,1±0,9% n=11, Iso+KN-93:7,7±0,9% n=5 vs. Iso:12,8±0,6% n=4 de 3 a 4 corazones distintos, P<0,05). En concordancia Epac1, detectada por Westernblot, sólo aumentó en membranas aisladas de corazones sometidos a perfusión prolongada con Iso (159±9% control n=4, P<0,05) con aumentos significativos en la fosforilación de Thr17 de fosfolamban, sustrato de CaMKII. Los datos muestran que Epac1 no participa en la respuesta aguda del Iso pero su rol es preponderante en el efecto inotrópico positivo de la estimulación ß-adrenérgica a tiempos prolongados, efecto que se asocia a su translocación a membrana. Estos resultados sugieren que la activación de Epac es un evento importante que permite el sostenimiento de la respuesta ß-adrenérgica.

NEUROCIENCIAS 2

136 (54) TE EN DOSIS NO TÓXICAS, ADMINISTRADO EN RATAS MADRE ALTERA LA EXPLORACIÓN MOTIVADA EN LAS HIJAS: EFECTO DEL SE

Silvia G. Ratti; Alejandro Azzolina; Edgardo O. Alvarez
Lab Neuropsicof Exptl, IMBECU

Se sabe que el Selenio (Se) participa en importantes reacciones metabólicas que afectan el comportamiento natural. Nuestro laboratorio ha mostrado previamente que Te altera estas conductas cuando es administrado en concentraciones no tóxicas. Se conoce que en los suelos los elementos traza se intercambian naturalmente. El objetivo de esta investigación fue evaluar si Se podría revertir algunas conductas como la exploración motivada. Para ello, se trabajó con ratas prepuberales provenientes de: ratas-madre sin tratamiento (C, control, n=10); ratas madres expuestas a 0.3 µg/L de ZnTe disueltos en el agua de beber después de la fecundación durante la preñez, lactancia y período prepuberal (Te, n=10); ratas madre expuestas a 0.3 µg/L de ZnTe y 1.07 µg/L de Na2O3Se (Se+Te, n=10) y ratas madre expuestas a Na2O3Se (Se, n=10). Al día 30, los hijos de los 4 grupos se sometieron individualmente al OVM (caja detectora de actividad motora, 5 min) y a la Prueba de Exploración Lateralizada (LDHB, 3 min). Toda la actividad conductual se expresa digitalmente en Cuentas/min (C/min). Los resultados en el OVM mostraron que el grupo tratado con Te mostró un aumento significativo en la Actividad Horizontal (2576±119 Vs 1764±216 C/5min, Vs C, p<0.05) y la Actividad Ambulatoria (1497±107 Vs 1074±175 C/5min, Vs C, p<0.01). En cambio, los grupos Se y Se+Te, sus actividades fueron similares a C. En el LDHB, los animales controles mostraron exploración sesgada a la izquierda (62±8 Vs 35.5 C/3min,Izq Vs Der) que no se observó en grupo Te (53±4.5 Vs 55±4.7 C/3min, n.s.), mientras que la lateralidad no fue afectada en los grupos Se y Se+Te (50±4 Vs 38±4 C/3min, p<0.05; 47±3 Vs 30±3 C/3min, Izq Vs Der p<0.05). En conclusión: los resultados apoyan nuestra hipótesis de un intercambio entre Se y Te con la consiguiente pérdida de algunas funciones comportamentales.

137 (65) VÍAS DE MUERTE CELULAR INDUCIDA POR MN EN CÉLULAS MICROGLIALES BV2

Soledad Porte Alcon; Agus- tina Alaimo; Roxana Mayra Gorojod; Mónica Lidia Kotler
Laboratorio de Apoptosis en el Sistema Nervioso y Nano-Oncología, QB-FCEN-UBA, IQUIBICEN-CONICET

El Manganismo es una enfermedad neurodegenerativa desencadenada por exposición crónica a manganeso (Mn) que resulta en su acumulación en el cerebro y consecuente muerte neuronal. Sus síntomas son similares a la enfermedad de Parkinson Idiopático. El daño inducido por Mn involucra también a las células gliales. El Mn activa la glia, generando la liberación de especies reactivas del oxígeno (ROS)/nitrógeno y citoquinas inflamatorias que exacerban el daño. Nuestro grupo ha demostrado que el Mn induce muerte celular y activación de células microgliales BV2; sin embargo, los mecanismos subyacentes no han sido dilucidados. Por lo tanto, nuestro objetivo se enfocó en estudiar las vías de muerte inducidas por el Mn en células BV2. Las células se incubaron con diferentes concentraciones citotóxicas del metal (250, 500 y 750 µM, 24 hs). El Mn aumentó hasta tres veces los niveles de ROS mitocondriales [MitoSOX Red; p<0,001 (250 µM)]. A 250 y 750 µM se detectó incremento en la expresión de TNF-α analizado por inmunocitoquímica y WB. La expresión de las pro-caspasas 8 y 3 disminuyó ligeramente a 500 y 750 µM (p<0,05), mientras que el producto de clivaje de pro-caspasa 9 (~33 kDa) disminuyó para las tres concentraciones de Mn (p<0,05). La pre-incubación con inhibidores específicos de caspasa-8 y -9, Z-IETD-FMK (10 µM) y Ac-LEHD-CMK (10 µM) respectivamente, no rescató de la muerte inducida por 250 µM de Mn (MTT). Por otra parte, el estudio mediante WB del balance Bax/Bcl-2, indicó una tendencia hacia la inducción de apoptosis (3 veces de aumento para 250 µM Mn). La inhibición de la quinasa RIP-1 empleando Necrostatina-1 (25 µM) no resultó en una reversión del efecto citotóxico inducido por Mn (MTT), lo cual indica que la muerte celular necroptótica no se encuentra activada. Los resultados obtenidos descartan la activación de una vía necroptótica de muerte y señalan a la apoptosis como posible responsable parcial de la citotoxicidad inducida por Mn.

138 (132) NEUROPROTECCIÓN POR ESTRADIOL EN LA ENCEFALOPATÍA DE LA RATA ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSA (SHR): PARTICIPACIÓN DEL FACTOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DEL CEREBRO (BNDF), TNFα Y RECEPTORES DE ESTRÓGENO

Julieta Correa[1]; Labombarda Florencia[12]; Brocca M.Elvira[1]; De Nicola Alejandro F.[12]; Pietranera Luciana[12]
IBYME[1] Fac. de Medicina. UBA[2]

El 17β-estradiol (17β-E2) revierte anormalidades en el hipocampo en un modelo de hipertensión experimental, la SHR. Existen dos subtipos del receptor clásico para 17β-E2 (ER): ERα y ERβ. Poseen una distribución neuroanatómica distinta, siendo el segundo mayormente expresado en el SNC y el primero responsable de las acciones sistémicas del 17β-E2. Ambos están involucrados en los efectos neuroprotectores de este esteroide en el hipocampo. Existen evidencias que el TNFα modula la expresión de la neurotrofina BDNF. En este trabajo estudiamos mecanismos adicionales que median las acciones neuroprotectoras del 17β-E2 sobre la encefalopatía hipocampal de la SHR. Para ello se trataron ratas macho SHR (PA: 180 mm Hg) y WKY de 16 semanas de vida con agonistas específicos para los receptores ERα (PPT) y ERß (DPN) mediante inyecciones s.c de 2.5 mg/kg día por medio durante 2 semanas. Los animales se sacrificaron, se extrajo el ARNm de los hipocampos y se realizaron PCR en tiempo real para BDNF y TNFα. En situaciones basales, la SHR mostró menor expresión del ARNm para BDNF y TNFα (p<0.05). El tratamiento con 17ß-E2 aumentó la expresión de BDNF y disminuyó aún más la de TNFα. La activación selectiva de ERα con PPT disminuyó los niveles de TNFα (p<0.05), mientras que DPN no los modificó. DPN fue más potente que 17ß-E2 para aumentar BDNF. Los resultados demostraron que los animales SHR tienen menor expresión de BDNF y de TNFα. El tratamiento con 17ß-E2 aumenta la expresión de BDNF, posiblemente de manera directa a través de su elemento respondedor en el promotor de BDNF, y regula en baja al TNFα, sugiriendo que la estimulación de ambos ERα y ERß cumplen funciones complementarias. El análisis de los efectos de los agonistas

selectivos de los ER podrían sentar las bases para su posible utilidad terapéutica en la neuropatología de la hipertensión experimental.

139 (202) LA ACTIVIDAD PROLIFERATIVA EN LA RETINA DE ZEBRAFISH ES INHIBIDA POR ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS Y TETRODOTOXINA (TTX)

Matias Pedro Medrano; Claudio Bejarano; María Paula Faillace
IFIBIO – Houssay

El zebrafish (ZF) es un modelo experimental para estudiar procesos plásticos de crecimiento o regeneración. La retina de ZF, a diferencia de los mamíferos, crece a partir de una zona proliferativa marginal (CMZ) mientras que en el tejido diferenciado se agregan bastones originados de precursores derivados de la glía de Müller. Ante un daño, la retina se regenera a partir de células progenitoras originadas por activación mitótica de la glía de Müller. El glutamato transmite la información fótica desde los fotorreceptores a las células bipolares (CB) y de éstas a las células ganglionares (CG) y también desde los fotorreceptores a la glía de Müller. Se utilizó DNQX (antagonista de los receptores AMPA-Kainato), expresados en las CB-OFF y las CG. Resultados previos indicaron que las subunidades del receptor AMPA se expresan en CMZ y retina madura. TTX bloquea los canales de sodio dependientes de voltaje y la actividad eléctrica. Todos los compuestos se inyectaron en el vítreo incluyendo bromodeoxiuridina (BrdU) que fue inyectada 4 h previas a la eutanasia. Se determinó inmunorreactividad (IR) para BrdU y la proteína CREB fosforilada (pCREB) en retinas intactas tratadas con TTX o DNQX. Los tratamientos con DNQX (100 µM, durante 20 h) y TTX (14 µM, durante 1 semana) disminuyeron significativamente la proliferación celular en la retina madura. TTX también tuvo un efecto inhibitorio en la CMZ. Ambos tratamientos inhibieron significativamente la IR de pCREB, principalmente en las capas internas y los fotorreceptores, indicando una disminución de la actividad neuronal. Se examina al presente el efecto del TTX y DNQX sobre la actividad proliferativa en la retina inducida por un daño. El glutamato regula la actividad mitótica en la retina madura intacta y por consiguiente el crecimiento retiniano en el ZF adulto. La despolarización de las células retinianas controla positivamente la actividad mitótica de los progenitores neuronales tanto en la CMZ como en el tejido diferenciado.

140 (239) ANFETAMINA REPETIDA A TRAVÉS DE LOS RECEPTORES AT1 INDUCE UN EFECTO FACILITADOR SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA Y PEROXIDACIÓN LIPÍDICA CEREBRAL

Brenda S. Casarsa[1]; María De Los Angeles Marinzalda[1]; Natalia A. Marchese[2]; Martin Basmadjian[2]; Gustavo Baiardi[1]; Claudia Bregonzio[2]
Lab. Neurofarmacología, FCQ, UCC, IIByT-CONICET[1] Dep. Farmacología, FCQ, UNC, IFEC-CONICET[2]

La Angiotensina II (Ang II) es pro-inflamatoria y se conoce que tanto Ang II como la administración de anfetamina (ANF), producen un aumento de: ICAM-1, HSPs, TNF-α, IL-6 y R-AT1 a nivel central y periférico, además de promover el daño oxidativo (peroxidación lipídica) a nivel de la vasculatura cerebral. Se ha descripto que estos efectos deletéreos de Ang II son mediados por la estimulación de los receptores AT1 (R-AT1). El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la exposición repetida a ANF y el rol de los R-AT1 sobre: a) respuestas inflamatorias en la vasculatura cerebral (HSP-70 y R-AT1) y en el líquido cefaloraquideo -LCR- (IL-6 y TNF-α) frente a ANG II icv.; b) peroxidación lipídica en la microvasculatura cerebral, 7 ó 21 días posteriores a ANF frente a un challenge de ANF. Se usaron ratas Wistar macho (250-320g), pretratadas con bloqueante de los R-AT1 -candesartan- (3mg/kg v.o)/vehículo por 10 días e inyectadas con ANF (2.5mg/kg i.p)/salina del día 5 al 10. El día 10 ó 26, se colocaron las cánulas icv. El día del experimento (día 18 ó 32), recibieron Ang II (400pmol icv.) ó challenge de ANF (0,5mg/Kg i.p). Noventa minutos después de Ang II y 60 minutos después del challenge, se extrajo LCR y se aislaron microvasos cerebrales. Resultados: La exposición repetida a ANF en respuesta a Ang II icv. produjo un aumento en: a) IL-6 y TNF-α en el LCR b) intensidad de inmunofluorescencia para R-AT1 y HSP-70 en microvasos cerebrales. El pretratamiento con candesartan previno estas respuestas, así como el aumento en la peroxidación lípidica de la microvasculatura cerebral. Los resultados obtenidos nos permiten concluir que la exposición repetida a ANF estimula los R-AT1 lo que induce un aumento en los marcadores de inflamación y peroxidación lipídica cerebral en respuesta a Ang II icv. y a ANF aguda respectivamente.

141 (274) ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS ADAPTADORAS AP-2 EN EVENTOS DE EXCITOTOXICIDAD.

Maríana Elizabeth Troncoso[12]; Joana Asensio[1]; Alicia Seltzer[1]; Miguel Angel Sosa[13]
IHEM - CONICET[1] Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad Nacional de Cuyo[2] Facultad de Ciencias Médicas - Universidad Nacional de Cuyo[3]

Antecedentes: La endocitosis mediada por vesículas cubiertas con clatrina es un proceso crucial para el mantenimiento de la integridad neuronal. La cubierta de las vesículas tiene proteínas adaptadoras. AP2 es un heterotetrámero formado por subunidades α, β2, µ2 y d2. En el tejido nervioso se han descrito dos isotipos de α, α1 y α1, y su co-existencia aún no ha sido explicada. Objetivos: Estudiar el comportamiento de ambas subunidades α en neuronas, en modelos animales o en líneas celulares, sometidos a diferentes condiciones de excitotoxicidad. Metodología: Cultivos de líneas celulares: neuronas estriatales; StHdhQ7 (normales) y StHdhQ111 (con extensión poliglutamina típica de la enfermedad de Huntington), fueron tratadas con 250 uM de ácido quinolínico (AQ) durante 3 o 6 hs. Las células fueron procesadas para estudios de IFI, o de inmunoblot, utilizando un anticuerpo anti-AP2. Animales: se realizó una lesión por hipoxia-isquemia (H/I) a ratas (Wistar – Kyoto) de 7 días de edad. El tejido cerebral se extrajo a los 5 días post-lesión. Para evaluar la presencia de proteínas "docking" para AP-2 en membranas de cerebro de ratas o de las células, se realizaron ensayos "binding" con AP-2 obtenidas de cerebro bovino. Resultados: En células se observaron (por IFI y WB) diferencias en la expresión de AP-2 entre ambas líneas celulares, siendo menor en las Q111, pero con una distribución perinuclear que co-localiza con golgina. El tratamiento con AQ indujo cambios en ambas líneas celulares; con una redistribución dispersa, pérdida de co-localización con golgina y un aparente aumento de la expresión en las Q111. En animales se observó un aumento de AP-2 en la corteza de H/I del lado contralateral, y una tendencia similar en hipocampo. En los ensayos "binding" se observó que la subunidad α1 tiene afinidad por membranas, la cual es menor en la corteza de animales H/I. Concluimos que la maquinaria endocítica podría ser alterada por la excitotoxicidad.

142 (294) LA INHIBICION DE NNOS REVIERTE LA SENSIBILIZACION A COCAÍNA: IMPORTANCIA DEL HIPOCAMPO EN LA EXPRESIÓN DE ESTE FENÓMENO

Emilce Artur De La Villarmois[1]; Laura A. Gabach[12]; Valeria P. Carlini[3]; Mariela F. Perez[12]
Fac. de Cs. Químicas, Univ. Nac. de Coórdoba[1] IFEC-CONICET[2] INICSA-CONICET, Fac.de Medicina, Univ. Nac.de óordoba[3]

La sensibilización comportamental es un aumento en la respuesta al efecto hiperlocomotor producido por la administración repetida de psicoestimulantes que subyace a la búsqueda y la recaída a las drogas de abuso. El hipocampo (HP) es una región del cerebro importante para procesos de aprendizaje asociativo que ocurren durante la adicción. El óxido nítrico es un neurotransmisor que participa en la plasticidad sináptica en el HP y en los efectos conductuales de cocaína (COC). Estudios de nuestro grupo demostraron un papel clave de la vía nNOS/

NO/sGC/GMPc en el desarrollo de la sensibilización a COC y en la mejora de la plasticidad sináptica del HP, ya que la inhibición de nNOS durante la administración de COC previno la sensibilización. En este trabajo proponemos determinar si la inhibición de nNOS después de la administración de COC es capaz de revertir la expresión de la sensibilización comportamental y caracterizar la participación del HP en este fenómeno. Para ello ratas Wistar macho fueron administradas con COC (i.p. 15 mg/kg/día) durante 5 días. Un grupo recibió el inhibidor de nNOS, 7-nitroindazole (7-NI, 50 mg/kg/día) por los siguientes 5 días, y otro una única administración intra-HP (16.31 µg/µl) de 7-NI. En ambos casos se evaluó la expresión de la sensibilización 24 hs después de la última administración de 7-NI, el umbral para generar LTP en el HP mediante electrofisiología (in vitro, indicador de plasticidad sináptica) y los niveles de proteína de nNOS por Western Blot. Los resultados mostraron que la inhibición de nNOS por ambas vías revirtió la expresión de sensibilización, la plasticidad sináptica HP asociada y el incremento en la expresión de nNOS en animales sensibilizados. Concluimos que el HP tiene un rol fundamental en la expresión de la sensibilización a COC, enfatizando la participación de la nNOS en este fenómeno. La interferencia de esta vía de señalización podría ser utilizada para reducir la vulnerabilidad a la adicción.

143 (307) ALTERACIONES PRODUCIDAS POR LA ASFIXIA PERINATAL EN EL PATRÓN DE NEURONAS SECRETORAS DE REELINA EN LA CORTEZA PREFRONTAL DE LA RATA

Pablo Vazquez; Elena Peña; Maríana Noto; Pablo Jusim; Fabián Loidl
IBCN

La asfixia perinatal, un déficit global y transitorio en el aporte de oxígeno al feto en el período peri-parto, aumenta 5 veces la probabilidad de padecer esquizofrenia a largo plazo. En la fisiopatología de este trastorno psiquiátrico se encuentra involucrada la molécula de matriz extracelular reelina. Esta proteína juega un papel importante en la migración neuronal durante el desarrollo así como en la maduración y plasticidad de dendritas y espinas sinápticas. En este trabajo analizamos el efecto que la asfixia perinatal produce en la distribución de neuronas que expresan reelina en la corteza prefrontal prelímbica de ratas (PN35). Se utilizaron los siguientes grupos experimentales: nacidas por parto vaginal (VC), nacidas por cesárea (CC) y sometidas a asfixia perinatal por 19 min (PA). Se realizaron cortes coronales de corteza prefrontal de 40 µm y se tomaron fotografías panorámicas incluyendo todas las capas de la corteza con una profundidad aproximada de más de 1000 µm y un grosor lateral de 850 µm. Para los conteos se analizó tanto la frecuencia como la distancia de las células marcadas a la línea central interhemisférica (superficie de la corteza) utilizando el programa Image J. Con los datos preliminares analizados se observa que el número de células con marcaje inmunohistoquímico para reelina tiene una tendencia a disminuir en el grupo PA (media de células marcadas por foto panorámica ±ES: VC 176,0±20,00; CC 196,3±36,75; PA 154,4±28,98). Esta disminución es más pronunciada en las capas más profundas (entre los 900 y 1000 µm de profundidad) alcanzando significancia estadística (p=0,0203, media CC 19,00; PA 5,16). La disminución en el marcaje de neuronas con reelina en PA podría estar relacionado con una disminución en el grosor de la corteza producido por la asfixia. Los pasos siguientes de esta investigación estarán orientados a analizar otros tipos neuronales.

144 (328) EL CONSUMO COMBINADO DE ALCOHOL Y BEBIDAS ENERGIZANTES PROLONGA LA RESACA ALCOHÓLICA EN UN MODELO EXPERIMENTAL EN RATÓN

Lucas G Asorey; Barbara J Gonzalez; Lucia Frankon; Silvia Carbone; Rodolfo A Cutrera
IFIBIO Houssay

Se denomina resaca alcohólica al conjunto de signos y síntomas que tienen lugar luego de una ingesta excesiva de alcohol (OH), cuando la alcoholemia es próxima a cero. En relación a la mezcla de OH y bebidas energizantes (BE), es una práctica que se incrementó entre los jóvenes. Se analizó el efecto combinado del OH y BE sobre la resaca alcohólica en parámetros motores y motivacionales, en un modelo experimental en ratón. Ratones de la cepa Swiss (n=160), de tres meses de edad, mantenidos en un régimen de 12:12 LO (apagado de las luces a las 7 pm) alimento y agua 'ad libitum' recibieron uno de los siguientes tratamientos: Sal+Sol. azucarada; Sal+BE; OH+sol. azucarada; OH+BE. Las dosis de OH fue en todos los casos de 3.8 gr/kg BW (sol 20% V/V) inyectada i.p. La utilizada para BE fue 18 ml/kg, por gavage. Los controles recibieron volúmenes equiparables de solución salina (para el OH) y una solución azucarada isocalórica en el caso de BE. Los animales fueron evaluados una hora antes de recibir uno de los tratamientos descriptos (7 am). Los diferentes tratamientos fueron administrados a las 8 am. Las mediciones comenzaron a las 2 pm (comienzo de la resaca alcohólica). Se hicieron mediciones a las 8 pm y a las 2 am. Las pruebas comportamentales usadas fueron campo abierto y laberinto en cruz. Los resultados mostraron en el caso de la actividad locomotora, una disminución significativa a las 2 pm en los grupos OH+sol. azucarada y OH+BE respecto a sus controles ($p<0.05$; ANOVA Univariado-Bonferroni, para campo abierto; $p<0.001$ para laberinto en cruz). Sin embargo, esta diferencia se mantuvo solo para OH+BE a las 7 pm ($p<0.001$ para ambas pruebas). Con respecto al comportamiento símil-ansiedad, se observó un aumento significativo para los grupos OH+sol. azucarada; OH+BE a las 2 pm ($p<0.05$) tanto en la prueba de campo abierto como en el laberinto en cruz. Estos resultados indican que la combinación OH+BE prolonga unicamente los efectos motores de la resaca alcohólica.

145 (335) TRPV4 CONTRIBUYE AL POTENCIAL TRANSMEMBRANA AFECTANDO LA RESPUESTA DE REGULACIÓN DE VOLUMEN EN CÉLULAS DE MÜLLER DE LA RETINA

Vanina A Netti; Juan Fernandez; Maia Kalstein; Alejandro Pizzoni; Gisela Di Giusto; Valeria Rivarola; Paula Ford; Claudia Capurro
Laboratorio de Biomembranas, IFIBIO-Houssay, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

En la retina, las células de Müller controlan la homeostasis del medio extracelular donde la actividad neuronal altera los gradientes osmóticos favoreciendo el swelling celular. Este swelling es seguido de una respuesta reguladora de descenso de volumen (RVD), mediado parcialmente por un flujo isoosmótico de KCl y agua a través de canales iónicos y de Acuaporina-4 (AQP4). Recientemente mostramos en un modelo de células de Müller humanas (MIO-M1) que el RVD es fuertemente modulado por cambios en el potencial de membrana (Vm). El objetivo de este trabajo fue evaluar los mecanismos relacionados con el RVD haciendo particular hincapié en el canal de Ca2+-mecanosensible TRPV4. El volumen celular, la concentración de Ca2+ intracelular y el Vm fueron evaluados en las células MIO-M1 empleando sondas fluorescentes en medios iso e hipotónicos. Los resultados mostraron que, en condiciones isotónicas, la inhibición de TRPV4 con RN1734 induce una despolarización celular, mientras que la activación del canal con 4α-PDD causa un descenso del Vm, ambas dependientes del Ca2+ externo, indicando que existiría una interacción funcional entre TRPV4 y canales de K+ sensibles a Ca2+ que determina el Vm de reposo. Frente a un swelling celular existe un leve incremento de Ca2+ intracelular, independiente del TRPV4, pero la inhibición del mismo anula los cambios en el Vm inducidos por el swelling osmótico. Sin embargo, la activación farmacológica del TRPV4 produce un gran incremento del Ca2+ intracelular que aumenta la eficiencia del RVD. En conjunto estos resultados muestran que en células de Müller el TRPV4 participa en modo indirecto en el establecimiento del Vm en estado estacionario. Si bien el TRPV4 no está involucrado en el influjo de Ca2+ inducido por el swelling osmótico, sí participa de los cambios en el Vm que ocurren durante el RVD, modulando los gradientes electroquímicos para el eflujo de iones determinando la eficiencia de la recuperación del volumen celular.

146 (338) EFECTO DEL LIPOPOLISACÁRIDO (LPS) DE ESCHE- RICHIA COLI SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN CEREBRO DE RATAS SOBRECARGADAS CON FE

Natacha Estefanía Piloni; Elizabeth Robello; Susana Puntarulo
IBIMOL

El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto del LPS (4 mg/kg) en ratas Sprague Dawley expuestas a sobrecarga de Fe-dextrán. En el modelo de sobrecarga subcrónica (6 dosis, 50 mg/kg, cada 48 h) las ratas, luego de 72 h de la administración de la 6ta dosis recibieron una dosis ip de LPS (Fe-LPS) y los controles (LPS) recibieron 6 dosis de solución fisiológica previo a la administración de LPS. Luego de 78 h del tratamiento con Fe-dextrán y 6 h post administración de LPS (grupo Fe-LPS), se observó un aumento significativo del contenido de Fe total (329 ± 32 pmol/mg PF) con respecto al valor en controles (solución fisiológica) (202 ± 6 pmol/mg PF) y con respecto a los datos en cerebro de animales tratados con LPS (219 ± 4 pmol/mg PF). Ni la relación ascorbilo/ascorbato, determinada por Espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica y HPLC, respectivamente, ni el contenido de TBARS (determinado espectrofluorométricamente) se modificaron significativamente luego de 78 h en cerebro de animales tratados con sobrecarga subcrónica de Fe, ni en presencia ni ausencia de LPS con respecto a los controles. En el tratamiento agudo (1 dosis 500 mg/kg), la administración de Fe o de Fe y LPS, llevó a un aumento significativo de Fe tanto en ausencia (3584 ± 928 pmol/mg PF) como en presencia de LPS (3249 ± 554 pmol/mg PF), mientras que el contenido de radical ascorbilo sólo se incrementó en el cerebro de animales sobrecargados con Fe en ausencia de LPS (159 ± 41 pmol/mg PF), con respecto al control (122 ± 19 pmol/mg PF) a las 6 h post-tratamiento. Estos resultados sugieren que la administración simultánea de Fe agudo y LPS tendría un efecto protector a nivel oxidativo en el medio hidrofílico por la capacidad del NO-LPS dependiente de quelar Fe. En cambio, la administración de LPS posterior a un tratamiento subcrónico con Fe, no afecta la condición redox, sugiriendo la estrecha relación entre la respuesta oxidativa y el protocolo de administración de Fe y LPS.

147 (520) ROL DE LAS CÉLULAS GLIALES DE MÜLLER EN LA REGENERACIÓN DE LA RETINA

Yanel Andrea Volonté[12]; Olga Lorena German[12]; Marcos Javier Dibo[1]; María Victoria Simon[12]; Nora Patricia Rotstein[12]; Luis Enrique Politi[12]
INIBIBB; Univ. Nac.del Sur[1] Univ. Nac. del Sur[2]

La retinitis pigmentosa, al igual que en su modelo animal, los ratones rd, es una enfermedad neurodegenerativa de la retina que conduce irreversiblemente a la ceguera por muerte de las neuronas fotorreceptoras (FR) por apoptosis. Dado que se carece aún de tratamientos efectivos para esta enfermedad, una estrategia prometedora es la de lograr regenerar los FR eliminados utilizando células gliales de Müller (CGM), consideradas células madre. Se ha demostrado que las CGM regeneran la retina en peces y, aunque son potencialmente capaces de regenerar los FR en mamíferos, no lo hacen ni en la retinitis pigmentosa ni en los ratones rd. Una de las causas posibles de este defecto es que la degeneración progresiva de los FR en estas enfermedades alteraría el "diálogo" neuro-glial requerido para el normal funcionamiento de las CGM. Para investigar este problema comparamos cultivos primarios mixtos neuro-gliales y co-cultivos de CGM y progenitores de FR, obtenidos de retinas de ratones normales (wt) o rd recién nacidos. Determinamos la presencia de características de células madre en las CGM evaluando la capacidad proliferativa, por incorporación de BrdU, la expresión de nestina, un marcador de células madre y de la lámina nuclear, cuya integridad se correlaciona con la morfología nuclear y con la mitosis. Las CGM rd presentaron mayor número de núcleos con morfologías y acumulaciones de la lámina nuclear anormales respecto de los wt. Además, las CGM en los cultivos mixtos rd mostraron menor expresión de nestina e incorporación de BrdU que los wt. Notablemente, cuando las CGM rd se co-cultivaron con neuronas wt, aumentó la expresión de nestina en las CGM rd, sugiriendo que la interacción de las CGM con FRs rd podría alterar su potencial regenerativo. Estos resultados sugieren que la degeneración de los FRs rd alteraría el "diálogo" normal de los FRs con las CGM, contribuyendo así a interferir con su capacidad regenerativa.

TOXICOLOGÍA 1

148 (98) LA REGULACIÓN EPIGENÉTICA DEL GEN DE β-CASEÍNA DURANTE LA ACTIVACIÓN SECRETORIA EN LA GLÁNDULA MAMaría ES MODIFICADA POR LA EXPOSICIÓN PERINATAL A BISFENOL A

Altamirano, Gabriela A.; Delconte, Melisa; Gómez, Ayelén; Masat, Eduardo; Luque, Enrique H.; Muñoz-De-Toro, Mónica; Kass, Laura
Instituto de Salud y Ambiente del Litoral, CONICET-UNL, Fac. Bioquímica y Cs. Biológicas (UNL)

Previamente demostramos que la exposición perinatal a Bisfenol A (BPA) altera la diferenciación funcional de la glándula maMaría y el contenido proteico de la leche, induciendo principalmente una baja expresión de β-caseína (β-cas) al finalizar la gestación. Nuestro objetivo fue estudiar si la exposición perinatal a BPA produce cambios en los mecanismos de regulación epigenética de β-cas durante la activación secretoria de la glándula maMaría. Ratas Wistar preñadas (F0) fueron expuestas a través del agua de bebida a BPA (0, 0.6 o 52 ug/kg/día) desde el día 9 de gestación (DG9) hasta el destete. Las crías hembras (F1) fueron preñadas y se obtuvieron muestras de glándula maMaría en DG21 y día 2 de lactancia (DL2). Utilizando RT-PCR en tiempo real se analizó la expresión de los ARNms de β-cas, de las histonas-deacetilasas (HDAC1 y HDAC3) y de la histona metiltransferasa EZH2. Además, se realizó un análisis de metilación de β-cas utilizando enzimas de restricción sensibles a metilación y posterior PCR en tiempo real. En ambos días estudiados, la exposición perinatal a BPA produjo una disminución en los niveles de β-cas y un aumento en la expresión de HDAC1. Mientras que en DL2, existió un aumento en la expresión de EZH2 en ambos grupos y una disminución de HDAC3 solo en el grupo BPA52. También en DL2, se observó hipermetilación del gen de β-cas en dos de los sitios estudiados, enhancer y exón 7. En conclusión, la exposición perinatal a BPA induce alteraciones en la expresión de enzimas claves en la regulación epigenética de β-cas. Estos cambios se ven reflejados en los mecanismos de metilación diferencial, indicando que existe una falla en la transcripción del gen, y en consecuencia, una menor expresión de β-cas. Nuestros resultados sugieren que, el BPA actúa sobre la glándula maMaría modificando la regulación epigenética de genes asociados con su diferenciación funcional.

149 (151) BÚSQUEDA DE MARCADORES PRONÓSTICOS EN INTOXICACIONES AGUDAS POR MONÓXIDO DE CARBONO

Cortez, Analía E; Galarza, Rocío A; Rhon Calderón, Eric A; Faletti, Alicia G.
CEFYBO - CONICET, Facultad de Medicina – UBA

La intoxicación aguda por monóxido de carbono (CO) es frecuente en nuestro país y tiene un alto riesgo de mortalidad. Es más, aquellos pacientes que sobrevivieron a una intoxicación aguda por CO tienen alto riesgo de sufrir el denominado Síndrome neurológico tardío (SNT) en un futuro con secuelas irreversibles sobre el sistema nervioso central. El SNT puede presentarse desde una semana o en meses después de la intoxicación. El objetivo de este trabajo fue la búsqueda de marcadores pronósticos que nos permitan prever el desarrollo del SNT. Para ello se utilizaron ratas machos adultas expuestos a CO en dosis agudas capaces de causar la pérdida de conciencia (6000 ppm por 20 segundos) y se estudió daño genético mediante ensayo cometa, expresado como porcentaje de ADN presente en la cola del cometa, en sangre periférica (SP), médula ósea (MO) y cerebro (Cbro), a 1 y 24 h y a los 7 y 30 días de la exposición. A 1 h encontramos que las ratas expuestas al CO (CO) exhibían mayor daño genético en SP (14±3, $p<0.05$) y MO (31±3, $p<0.01$) respecto a ratas controles (C 5,1±0,6;

15±2, respectivamente). A los 7 días encontramos mayor daño genético en MO (27±2, p<0.001) y Cbro (36±3, p<0.05) respecto a los C (10±2; 27±3, respectivamente). Asimismo, observamos una relación entre los resultados obtenidos entre SP y MO a 1 y 24 h de exposición y aquellos obtenidos entre MO y Cbro a los 7 d de la exposición. Si bien en un futuro estos resultados serán confrontados con la observación de los micronúcleos presentes en MO, estos datos preliminares nos estarían indicando que la evaluación genética, mediante el ensayo cometa, nos podría orientar en el pronóstico de un posible desarrollo de SNT después de una intoxicación aguda.

150 (244) CARACTERIZACIÓN TOXICOLÓGICA DEL EXTRACTO COMERCIAL FRACCIÓN D MAITAKE (GRIFOLA FRONDOSA) ADMINISTRADO POR VÍA ORAL EN BIOMODELOS ANIMALES

Aguilera Braico, Diego Máximo; Santa Coloma, Tomás; Balogh, Gabriela Andrea
BIOMED

Mediante el método de la Dosis Fija, se estudió la toxicidad aguda administrando oralmente una única dosis de 2000 mg/kg peso de Fracción D de Maitake (Pro4X) empleando 5 ratones machos y 5 hembras normales de 6-8 semanas de edad de la cepa BALBc. Los animales fueron divididos en dos grupos, Grupo control y Grupo Tratado. Luego de 14 días de observación, hallamos que la mortalidad inducida por la administración oral única de 2000 mg/kg peso de Fracción D de Maitake (Pro4X) fue del 0%. Los resultados indican que el tratamiento con Fracción D Maitake significativamente incrementa el peso de los animales del Grupo tratado (24.5±1.49) con respecto a los animales del Grupo Control (22.57±2.19), p<0.05. Además, observamos que Maitake disminuye el valor del hematocrito% (desde 33.00±1.22 hasta 28.20±4.44, p<0.05); y el valor de hemoglobina% (desde 11.18±0.41 hasta 9.52±1.53, p<0.05). Por otra parte, realizamos estudios para evaluar Toxicidad sub-aguda de la Fracción D de Maitake Pro4X empleando una dosis diaria de 5 mg/kg/día administrado oralmente durante 28 días consecutivos empleando 5 ratones machos y 5 hembras divididos en: Grupo Control y Grupo Tratado. Luego de finalizado el tratamiento, los animales fueron sacrificados para evaluar los órganos internos, aspecto macroscópico, el peso de los mismos; los cuales fueron reservados para estudios histológicos en tacos de parafina y el resto fue congelado a -80ºC para posteriores estudios genómicos. De los experimentos de toxicidad en dosis aguda y sub-aguda podemos concluir que la Fracción D de Maitake (Pro4X) no ha demostrado signos de toxicidad en ninguno de los dos ensayos, con una mortalidad del 0% y un valor de DL50 que se sitúa por encima de los 2000mg/kg peso. Hasta el momento, podemos inferir que Fracción D Maitake demuestra ser un compuesto seguro y no-toxico e inocuo para el tratamiento de animales. Este proyecto fue subsidiado por el BIOMED-UCA-CONICET.

151 (310) ESTUDIO DE LA INDUCCIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DE ENZIMAS CITOCROMO P450 POR qPCR EN CÉLULAS JEG-3 POR LA EXPOSICIÓN A CLORPIRIFOS

Victoria Sánchez[1]; Natalia Guiñazú[12]
LIBIQUIMA, Depto de Química, Facultad de Ingeniería, Univ.Nac.Del Comahue[1] Departamento de Ciencias del Ambiente, FACIAS, Univ. Nac. Del Comahue[2]

La placenta expresa enzimas metabolizantes del sistema citocromo P450 como CYP1A2, CYP2D6 y CYP3A4. Estas enzimas pueden ser reguladas por factores ambientales, lo que condiciona sus niveles de expresión y puede provocar alteraciones en la respuesta farmacológica, como así también en la susceptibilidad a la acción de tóxicos. Se conoce que mujeres embarazadas que residen en zonas rurales del Alto Valle, están expuestas ambientalmente a insecticidas organofosforados (OF). Considerando al trofoblasto como una célula participe del metabolismo, el objetivo de este trabajo fue analizar cambios en la expresión y actividad de enzimas CYP, en la línea celular de trofoblastos JEG-3 inducidos por la exposición a OF.Se estudió la expresión basal de ARNm de CYPs: 2D6, 2B6, 2C19, 1A2 y 3A4 por RT-PCR convencional en células JEG-3. Las células fueron además expuestas a diferentes concentraciones (0,01; 0,1; 1; 10 y 100 µM) del OF clorpirifos (Cp) por 8 h y se analizó la expresión de las CYP 2B6, 2C19, 1A2 y 3A4 respecto de los controles (DMSO 0,02%) por qPCR. Adicionalmente, se determinó actividad enzimática de 7-etoxycoumarina (ECOD) a las 24 h de exposición, por fluorescencia.Se observó que las células JEG-3 expresan las CYPs 2B6, 2C19, 1A2 y 3A4 en condiciones basales, aunque no se detectó expresión de 2D6. El estudio de niveles de transcripto luego de la exposición a Cp demostró inducción de CYPs 2C19, 2B6 y 3A4, 1,5 veces respecto del control sólo a la mayor concentración ensayada. Los ensayos de actividad enzimática ECOD no registraron aumento de la actividad enzimáticaEl OF Cp induce la transcripción de enzimas importantes para el metabolismo de drogas y xenobióticos, sin embargo nuestros resultados no son concluyentes debiéndose estudiar actividad enzimática a mayores tiempos de incubación. En el caso de comprobar cambios en la actividad inducida por OF, estos resultados tendrían relevancia en escenarios de coexposición a xenobióticos durante el embarazo

152 (315) LA EXPOSICIÓN A ORGANOFOSFORADOS ALTERA EL BALANCE REDOX CELULAR Y MITOCONDRIAL EN LA LINEA CELULAR TROFOBLASTICA JEG-3

Valeria Leticia Rivero Osimani[12]; Gladis Magnarelli[2]; Guiñazú Natalia[13]
LIBIQUIMA-Facultad de Ingeniería Uncoma[1] Facultad de Ciencias Médicas Uncoma[2] Facultad de Ciencias del Ambiente y La Salud Uncoma[3]

El principal mecanismo de neurotoxicidad de los plaguicidas organofosforados (OFs), es la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa. Sin embargo, otros mecanismos independientes de los colinérgicos como el estrés oxidativo han sido postulados. Las mitocondrias participan del balance energético y oxidativo en los trofoblastos. Considerando que alteraciones en la cadena respiratoria mitocondrial podría inducir estrés oxidativo el objetivo de este trabajo fue estudiar si la exposición de células JEG-3 a OFs afecta el estado redox mitocondrial y el sistema de defensa antioxidante. Las células JEG-3 fueron cultivadas en presencia de los OFs clorpirifos (Cp) y metilazinfos (Ma) 0,01; 1 y 100 µM por 4 horas. Se evaluó la viabilidad celular mediante la técnica de resazurina, y la actividad de catalasa (CAT), glutatión S transferasa (GST) y los niveles de glutatión reducido (GSH). Adicionalmente, se purificaron las mitocondrias mediante centrifugación diferencial y se determinó la actividad de la cadena respiratoria (complejos I+III y IV), y el estado oxidativo mitocondrial por fluorescencia con DCFDA. Los resultados muestran que ambos OFs disminuyen la viabilidad celular respecto del control (DMSO 0,02%) a todas las concentraciones ensayadas (p<0,001). Asimismo, Cp moduló la actividad de CAT; GST y los niveles de GSH a altas y bajas concentraciones, mientras que Ma solo aumentó la actividad de GST. El tratamiento con Cp disminuyó la actividad de los complejos I+III y IV a bajas concentraciones, y Ma mostró cambios significativos en todas las concentraciones ensayadas. Por otra parte Cp modifica el estado oxidativo mitocondrial sin observarse cambios significativos con Ma. Los resultados obtenidos demuestran que las mitocondrias son afectadas por los OFs, sin embargo, la extensión de las modificaciones celular dependen del principio activo utilizado. La disfunción mitocondrial, seria participe de los efectos citotoxicos y el desbalance redox observado.

153 (393) ACTIVACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN C-SRC/HER1 Y DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS-α EN MUESTRAS DE TUMORES MAMARIOS DE MUJERES EXPUESTAS AMBIENTALMENTE A BIFENILOS POLICLORADOS (PCBS)

Adriana Ridolfi[1]; Andrea Randi[2]; Carolina Pontillo[2]; Gloria Alvarez[1]; Nancy M. Olivera[1]; María Eugenia Rodríguez Girault[1]
Cátedra de Toxicología y Química Legal- Fac. de Farmacia y Bioquímica - Univ. de Buenos Aires[1] Laboratorio de

Efectos Biológicos de Contaminantes Ambientales-Fac. de Medicina - Univ. de Buenos Aires[2]

Los Bifenilos Policlorados (PCBs) son contaminantes orgánicos persistentes, se acumulan en tejido graso, exhiben propiedades de disruptores endócrinos, y se reclasificaron por la IARC como carcinógenos humanos. Existen 209 congéneres: de exposición (No DL-PCBs), y "tipo-dioxina" (DL-PCBs) similares a la TCDD, que se unen al receptor de hidrocarburos aromáticos. Dado el aumento de casos de cáncer de mama, y las consecuencias en morbilidad y mortalidad, existe interés en investigar la relación entre contaminantes ambientales y el riesgo de este tipo de cáncer. La activación de c-Src y del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (HER1) están involucrados en crecimiento y progresión tumoral. Compuestos tipo-dioxina muestran acciones estrogénicas, estimulando proliferación en células de cáncer mamario. Objetivo: evaluar en un estudio de caso-control en sueros y muestras de tumores mamarios de mujeres: a) niveles de congéneres de PCBs (cromatografía gaseosa), b) histopatología tumoral (histología H-E), c) vías de señalización de c-Src/HER1 y del Receptor de Estrógenos α (REα) (inmunoblot) y d) asociación entre tipos de PCBs y malignidad tumoral. Resultados: Los niveles de DL-PCBs fueron mayores en sueros (2,41±1,69 vs 1,42±0,72 ng/ml $p<0,01$) y tejido mamario (200,1±33,9 vs 61,1±49,2 ng/g de lípidos $p<0,05$) de mujeres con tumores malignos que benignos. En sangre predominaron los congéneres PCB-105, 118 y 126, y en tejido mamario PCB-156 y 118. Se encontró asociación positiva entre TEQs (Equivalentes Tóxicos) y riesgo de cáncer de mama (sangre:OR=1,118 $p=0,003$; tejidos:OR=2,143 $p=0,016$). La activación de c-Src (105% $p<0,01$) y la fosforilación en Tir845 del HER1 (210-350% $p<0,5$) fueron mayores en tumores malignos que en benignos. Encontramos mayor activación del REα fosforilado en Tir537 vía c-Src, en tumores malignos que en benignos. Concluimos que la exposición ambiental a PCBs tipo-dioxina podría contribuir al riesgo de cáncer de mama en la población estudiada.

154 (397) LA INTOXICACIÓN CRONICA CON CADMIO INDUCE HIPERTENSIÓN, ESTRÉS OXIDATIVO Y ALTERACIONES EN EL METABOLISMO LIPÍDICO EN AORTA DE RATA

Álvarez, Silvina; Boldrini, Gabriel; Perez Chaca, María V; Piguillem, Silvana; Gómez, Nidia; Giménez, María Sofía
IMIBIO-SL

El Cadmio (Cd) es un elemento tóxico y un contaminante ambiental. Estudiamos su efecto sobre la presión arterial, la histoarquitectura y marcadores de estrés oxidativo y metabolismo lipídico en la aorta de rata. Se utilizaron ratas macho, de la cepa Wistar: un grupo recibió agua común (control-Co) y el otro, 15 ppm de Cd en el agua de bebida por 60 días (Cd). Durante el tratamiento, se midió la presión arterial con un sistema CODA y se cuantificaron los niveles de Cd en aorta y suero. Se aisló ARN total con Trizol y se midió la expresión del factor Nrf2, NOX2, p47, GPx, SOD, NFKB, ACC, FAS, DGAT2, HMGCoAR, SREBP2 y CT por PCR. Las aortas fueron fijadas, seccionadas, teñidas y analizadas por microscopia óptica. La concentración de Cd en suero y aorta aumentaron significativamente en el grupo Cd ($p<0.05$). Cd indujo aumento significativo de las presiones sistólicas y diastólicas ($p<0.05$). NOX2 aumentó ($p<0.001$) en el grupo Cd, aunque p47 no mostró cambios. Nrf2 disminuyó en Cd ($p<0.05$), GPx no se modificó y SOD aumentó significativamente en el grupo Cd ($p<0.05$). NFKB no mostró diferencias. Con respecto al metabolismo lipídico, se observó una disminución en la expresión de ACC y FAS ($p<0.05$), sin cambios en DGAT2, sugiriendo una disminución en la síntesis de ácidos grasos. Por otro lado, SREBP2 y HMGCoAR aumentaron significativamente ($p<0.05$), indicando un incremento en la síntesis de colesterol endógeno. CT no mostró diferencias. A nivel estructural, en las aortas Cd se observaron láminas irregulares de células endoteliales rodeando el lumen, así como cambios estructurales en la túnica íntima, las células endoteliales presentan citoplasmas más grandes y claros que en las aortas controles. Las células de la túnica media en contacto con la íntima mostraron alteraciones semejantes. Esto demostraría que una intoxicación crónica con Cd induce hipertensión acompañada por un cuadro de estrés oxidativo, alteraciones en el metabolismo lipídico y cambios estructurales en aorta.

155 (472) LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DEL TGFβ-1 ESTÁN INVOLUCRADAS EN LA MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR INDUCIDAS POR UN DISRUPTOR ENDOCRINO, EN CÉLULAS DE CÁNCER MAMARIO

Noelia Victoria Miret[1]; Carolina Pontillo[1]; Clara Ventura[2]; Alejandro Carozzo[3]; Florencia Chiappini[1]; Diana Kleiman[1]; Natalia Fernandez[3]; Claudia Cocca[2]; Andrea Randi[1]
LEBCA, Fac. de Medicina, UBA[1] Lab Radioisótopos, Depto Físico Matemática, FFyB, UBA[2] Lab Transducción de Señales y Desarrollo de Fármacos, FFyB, UBA[3]

La exposición a contaminantes orgánicos persistentes puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama. El Hexaclorobenceno (HCB) es un contaminante ambiental, exponiéndose la población a través del alimento, el agua y el aire. Es un compuesto tipo-dioxina y un ligando débil del Receptor de Hidrocarburos Aromáticos (AhR). Demostramos que el HCB actúa como disruptor endócrino, estimulando proliferación, migración, invasión y metástasis en diferentes modelos de cáncer de mama. El Factor de Crecimiento Transformante-β1 (TGF-β1) es crítico en morfogénesis maMaría y está activado en cáncer de mama. Objetivo: estudiar en células de cáncer de mama humano MDA-MB-231, a) la acción del HCB (0,005; 0,05; 0,5 y 5 µM) sobre expresión, activación y vías del TGF-β1 (Western Blot), b) implicancia del TGF-β1 en la migración (cierre de herida) e invasión (transwell) inducidas por el tóxico, c) la regulación cruzada entre TGF-β1/AhR (RT-qPCR). Resultados: el HCB (0,05; 0,5 y 5 µM) incrementa los niveles proteicos de TGF-β1 ($p<0.01$) y su activación ($p<0.01$) a 2 y 6 h, así como estimula la fosforilación de Smad3 ($p<0.01$) y las vías independientes de Smad (JNK $p<0.01$ y p38 $p<0.05$) a 5, 15 y 30 min. La acción del HCB sobre la migración e invasión depende de Smad3, JNK y p38, mientras que ERK1/2 está involucrado en migración ($p<0.01$). El tóxico reduce los niveles de ARNm del AhR de manera dosis-dependiente (0,05 y 5 µM, $p<0.01$), similar al tratamiento con TGF-β1 ($p<0.001$), en cambio, ejerce el efecto opuesto en presencia de inhibidor de TGF-β1 (5 µM, $p<0.01$). La activación del AhR por HCB aumenta el contenido de ARNm del TGF-β1 (0,05 y 5 µM, $p<0.05$). Conclusión: en MDA-MB-231, el HCB induce expresión y activación del TGF-β1, modula el cross-talk entre TGF-β1/AhR, y estimula la migración e invasión involucrando vías dependientes e independientes de Smad3. Estos hallazgos aportan evidencias acerca del mecanismo molecular de acción del HCB en la progresión del cáncer de mama.

156 (589) ESTUDIO SOBRE LA ACTIVIDAD DE COLINESTERASAS EN SANGRE DE HABITANTES Y TRABAJADORES RURALES DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

Bonetto, Julián; Ostera, Juan Manuel; Irigoyen, Mara H.; Quiroga, Pa- tricia; Pagano, Eduardo; Villaamil Lepori, Edda
Facultad de Farmacia y Bioquímica – UBA

Durante 2014-15 en Argentina se cultivaron 25 millones de hectáreas de cultivos transgénicos habiéndose utilizado más de 335 millones kg de a productos fitosanitarios. Esta situación en Argentina, llevó a plantear que los pobladores y trabajadores podrían estar expuestos a agroquímicos, y verse afectadas las actividades de las colinesterasas plasmáticas (Che) y eritrocitarias (ACh) según la exposición, la época del año y las prácticas agropecuarias aplicadas. Se evaluaron poblaciones con gran producción agrícola. Por un lado, habitantes de los partidos de Chivilcoy-Bragado (CB) (N=59) zonas con un manejo cuidado de los agroquímicos. Por otro lado, se evaluó la actividad de dichas enzimas en individuos del partido de Pergamino (P) (N=152). Previa a la toma de muestras de sangre se realizó una encuesta a fin de separar en tres grupos: sujetos con exposición laboral (L), habitantes rurales o con exposición ambiental (A) y no expuestos (N). Se realizaron dos recolecciones de sangre, en

dos épocas diferentes según el calendario de aplicaciones de agroquímicos, una instancia previa al barbecho químico (pre-exposición) y una instancia posterior a la aplicación de insecticidas (pos-exposición). Se utilizó el método de Ellman para la medición de las actividades enzimáticas tanto de Che y AChe. Se observaron diferencias significativas durante el periodo de pre-exposición, en las actividades de las AChe y las Che entre P y CB (p< 0,001 y p< 0,05) respectivamente y entre las Che y las AChe al comparar los sujetos N y L (p<0,001 y p<0,01, respectivamente). Además, se registraron diferencias significativas en las actividades de AChe al comparar las instancias pre y post exposición, en los individuos que estuvieron presentes en ambos muestreos. Estos resultados indican que un manejo y uso cuidadoso de los agroquímicos podrían estar influyendo en la actividad de estas enzimas en los individuos evaluados. Estudio financiado con fondos del proyecto PID 0032/2011.

157 (628) INTOXICACIÓN CON CADMIO EN CEREBELO: EFECTO DEL TIEMPO DE EXPOSICIÓN Y DISTINTAS DIETAS PROTEICAS

Martín Molinero, Glenda Daniela; Álvarez, Silvina M.; Boldrini, Gabriel G.; Plateo Pignatari, Mara G.; Giménez, María Sofía.
IMIBIO-SL

Cadmio (Cd) es un elemento tóxico y un contaminante ambiental. Se estudió su efecto sobre marcadores de estrés oxidativo y apoptosis en cerebelo de rata, en presencia de dos dietas: una rica en caseína, y otra en soja, utilizando dos tiempos de exposición: un mes y dos meses. Se utilizaron 4 lotes de ratas hembras Wistar: 2 recibieron una dieta con caseína (Cas) y 2, con soja (So). En cada grupo, un lote recibió agua corriente (Control-Co) y el otro, 15 ppm de Cd en el agua de bebida. Esto se realizó por 30 y 60 días. Se extrajeron los cerebelos, se aisló ARN y se determino la expresión del factor Nrf2, NOX2, p47, GPx, SOD, Bax y Bcl2 por RT-PCR. A los 30 días, NOX2 aumentó en ambos grupos Cd (p<0.05), mientras que a los 60 días disminuyó en el grupo Cas-Cd sin variaciones en los grupos Soja. P47 mostró un incremento en So-Co a los 30 días, disminuyendo en Cas-Cd a los 60 días, con un aumento en So-Cd. El factor nrf2 aumentó en Cas-Cd a los 30 días, a su vez se observó un incremento en ambos grupos Soja (p<0.005), mientras que disminuyó en los grupos Cd a los 60 días. Paralelamente, GPx aumentó en Cas-Cd a los 30 días, y disminuyó en ambos grupos Cd a los 60 días (p<0.05). SOD aumentó en ambos grupos Cd (p<0.05) a los 30 días pero disminuyó en Cas-Cd, aumentando en So-Cd a los 60 días. La relación bax/bcl2 aumentó en Cas-Cd (p<0.05) siendo ésta menor en So-Cd, a los 30 días. A los 60 días esta relación fue más alta en Cas-Cd, mientras que disminuyó en So-Cd. Asimismo, en el grupo de 30 días se determinó la expresión de NFKB, el cual mostró un incremento en Cas-Cd, con una disminución en So-Cd (p<0.05) e Interferón gamma, el cual aumentó en ambos grupos Cd (p<0.05). Esto indica que la intoxicación con Cd induce un estado de estrés oxidativo con respuesta del sistema antioxidante a los 30 días, cambiando a los dos meses de exposición, donde aparentemente el sistema antioxidante se deprime. Esto es consistente con una mayor relación bax/bcl2, indicadora de apoptosis. Se observa que Soja brindaría mayor protección antioxidante.

HEMATOLOGÍA 2

158 (113) RELACIÓN ENTRE TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETS), NUCLEOSOMAS CIRCULANTES Y NIVELES DE MIELOPEROXIDASA (MPO) EN NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS (NMP)

Cecilia Paola Marin Oyarzun[1]; Agostina Carestia[2]; Paola Lev[1]; Ana Glembotsky[1]; Beatriz Moiraghi[3]; Miguel Casttro Ríos[4]; Rosana Marta[1]; Felisa Molinas[1]; Mirta Schattner[2]; Paula Heller[1]
Hematología Investigación. IDIM A. Lanari. UBA. UE IDIM-CONICET[1] Laboratorio de Trombosis Experimental. IMEX. CONICET-Academia Nacional de Medicina[2] Hematología. Hospital JM Ramos Mejía.[3] Centro de Hematología Clínica de San Isidro[4]

Las NMP se caracterizan por proliferación de células mieloides e incluyen la Policitemia Vera (PV), la Trombocitemia Esencial (TE) y la Mielofibrosis (MF). En base a la presencia de activación leucocitaria, tendencia trombótica y un microambiente inflamatorio, estudiamos en 41 pacientes (P) la capacidad de sus neutrófilos de formar NETs, la presencia de nucleosomas circulantes y su correlación con los niveles de MPO. La formación espontánea de NETs in vitro (inmunofluorescencia (IF) para ADN/elastasa) no difirió globalmente entre P y controles, 1.50±1.8% vs. 0.84±0.5%, p=NS, encontrándose elevada en 15% de los casos. En los neutrófilos de los P se halló aumento basal de especies reactivas del oxígeno (EROS), 21.2±24% vs. 4.9±1%, p<0.01 (citometría de flujo), si bien solo en 1/3 este aumento se asoció a la formación espontánea de NETs. Hubo significativamente menor formación de NETs en respuesta a PMA (IF), 39.62±23.9% vs. 53.36±18.3%, p<0.05, hallazgo confirmado por medición del ADN liberado (fluorimetría), 0.44±0.3 vs. 0.62±0.3 ug/mL, p=0.01. Este defecto se asoció a una menor generación de EROS (p<0.01). Los pacientes presentaron niveles mayores de nucleosomas circulantes, 0.23±0.2 vs. 0.09±0.04 ug/mL, p<0.0001 (ELISA), los cuales fueron leves en TE, moderados en PV y mayores en MF, sobretodo en estadíos avanzados, p<0.01 y también de MPO (ELISA), 84±61 vs. 48.8±12 ng/mL, p<0.05. No hubo correlación entre nucleosomas y NETs; la asociación con MPO fue moderada pero no significativa, mientras que sí hubo correlación con niveles de LDH sérica, r=0.69, p<0.0001. Como conclusión, se describe por primera vez la presencia de nucleosomas circulantes en NMP, que representan un marcador de enfermedad avanzada. La contribución de la NETosis al aumento de nucleosomas no es clara, mientras que su asociación con LDH sugiere que la lisis celular podría constituir una fuente de los mismos. El defecto en la producción de NETs y ROS en respuesta al PMA podría reflejar un defecto en la inmunidad innata en NMP.

159 (420) LA EXPRESIÓN DE OCT-2, OCA-B, BCL6, PU.1 Y IRF8 PREDICE PRONÓSTICO EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS GRANDES B

Julián Francio; Erica Rojas-Bilbao; Elisa Bal De Kier Joffe; Marta Zerga; Lydia Puricelli; Stella Maris Ranuncolo
IOAHR

El Linfoma Difuso de Células Grandes B (LDCGB), derivado del centro germinal (CG), es el linfoma No-Hodgkin más frecuente en adultos. Un tercio de los pacientes recae o resulta refractario al tratamiento estándard. No se dispone de marcadores capaces de predecir el pronóstico del paciente con LDCGB. El tránsito de las células B por el CG es controlado por la activación y represión secuencial de factores de transcripción (FT) importantes en su desarrollo. Oct2 y OCAB, son responsables del incremento de BCL6 en el CG, siendo reclutados hacia su gen blanco por PU1 y IRF8. La depleción de PU1 o IRF8, mediante shARNs en líneas celulares de LDCGB, mostró la disminución en la unión de Oct2/OCAB a BCL6, en ensayos de ChiP. Basándonos en estos hallazgos, evaluamos la expresión de Oct2, OCAB, BCL6, PU1 y IRF8 a nivel tisular mediante IHQ, en 73 pacientes con LDCGB [38 hombres Md edad y rango 59 (25-85); 35 mujeres 59 (17-82)]. El análisis univariado evidenció la ausencia de correlación entre la expresión de Oct2, BCL6 o IRF8 y los parámetros clínico-patológicos indicadores de pronóstico en LDCGB. El estudio de sobrevida global (SG), mediante las curvas de Kaplan-Meier, mostró que los pacientes con un porcentaje de células tumorales positivas ≥ 70% para Oct2, OCAB y BCL6 [(Log Rank Test X2=3,7) p=0.05; 4,0 p=0.04 y 4,0 p=0.04], se asoció con mal pronóstico y menor SG. El alto número de pacientes que mostró más del 70% de células positivas para Oct2, BCL6 y IRF8 contrasta con el 17% y el 5% para OCAB y PU1. Estos FT en condiciones normales, son esenciales en la formación del CG, mostrando altos niveles de expresión. Sin embargo, el 42% y el 63% de las muestras mos-

traron pérdida de OCAB y PU1. La evaluación de estos FT es de interés en el establecimiento del pronóstico de los pacientes con LDCGB. Estos resultados tienen trascendencia terapéutica dado que evidencia la necesidad de atacar simultáneamente múltiples interacciones entre múltiples factores en este linfoma a células B.

160 (471) EFECTO DE HOMOCISTEINA-TIOLACTONA EN CULTIVOS DE CÉLULAS ENDOTELIALES

María Eugenia Chamorro; Romina Maltaneri; Agustina Schiappacasse; Irene Quintana; Valeria Genoud;Daniela Vittori; Alcira Nesse
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, IQUIBICEN-CONICET

La hiperhomocisteinemia (HHcy) ha sido asociada a la disfunción e injuria endotelial involucrada en el desarrollo de trombosis y ateroesclerosis. Recientemente, se ha propuesto que la homocisteína-tiolactona (HTL), especie altamente reactiva, sería responsable de la acción perjudicial de la HHcy. La reacción de N-homocisteinilación ocurre cuando HTL acila los residuos lisina de las proteínas. La presencia de suero en el cultivo de células endoteliales permite su crecimiento, migración y desarrollo. El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de suero tratado con HTL en la migración de la línea endotelial EA.hy926. Suero fetal bovino fue incubado en presencia de HTL (concentraciones finales 2 y 4 mM) durante 18 h, a 37 °C (SFB-HTL). Control: SFB incubado con PBS. Por electroforesis capilar y electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas se observaron cambios en el patrón de bandas proteicas y, en particular, modificación de la movilidad electroforética de la albúmina. La disminución de la carga neta negativa de las proteínas corrobora el bloqueo de residuos lisina por la reacción de N-homocisteinilación. Se estudió la acción del SFB N-homocisteinilado sobre la migración celular mediante la prueba de scratching con la cuantificación de la migración por el ancho de la herida y sobre la proliferación celular por el ensayo de MTT. En presencia del SFB-HTL la migración celular disminuyó en comparación con los cultivos con SFB, en forma dependiente de la concentración de HTL (Tamaño de la herida: SFB 10±4,3%; *SFB-HTL2 37±7,1%; *SFB-HTL4 59±9,0%; *P<0,05 vs. SFB; n=5). La proliferación celular no fue alterada por la presencia del SFB-HTL. La N-homocisteinilación de las proteínas del suero altera su efecto promigratorio sobre las células endoteliales frente a una injuria, sugiriendo un posible mecanismo de acción antiangiogénica.

161 (494) OPTIMIZACIÓN DE LA PREPARACIÓN DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS PARA SU APLICACIÓN EN MEDICINA REGENERATIVA

Julia Etulain[1]; Nadia Cicconi[1]; Silvio Rosell[2]; Mirta Schattner[1]
Laboratorio de Trombosis Experimental, IMEX-CONICET. Academia Nacional de Medicina. CABA, Argentina.[1] Unidad de Hemoterapia. Hospital Tornú. CABA, Argentina.[2]

El plasma rico en plaquetas (PRP) se emplea en medicina regenerativa como fuente de factores proangiogénicos derivados de plaquetas, y se procesa y aplica siguiendo protocolos clásicos de coagulación y transfusión de plaquetas. Considerando que dichos protocolos no han sido optimizados para inducir regeneración tisular, el objetivo de este estudio fue optimizar la preparación del PRP para tal fin a través de diversas variables y estudiando la proliferación de las células endoteliales HMEC-1. El PRP o las plaquetas libres de plasma (PL) se estimularon con trombina (1U/ml) y CaCl2 (22mM) (37°C, 30min). Los sobrenadantes se incubaron con HMEC-1 por 24h y se determinó la proliferación celular (pnpp). Los resultados se expresan en veces del control sin estimular (n=6; *p<0.05 vs sin estimular; #p<0.05 vs PRP; &p<0.05 vs 37°C). Considerando que además de los factores proangiógenicos plaquetarios, el PRP contiene sustancias antiangiogénicas plasmáticas, se comparó la capacidad angiogénica del PRP con las PL. La proliferación de HMEC-1 inducida por PL fue mayor a la inducida por PRP (2.4±0.2**# vs 1.7±0.1*), y el efecto antiangiogénico del plasma fue revertido diluyendo el PRP con solución fisiológica (50%=2.2±0.2*, 25%=2.4±0.2**, 12%=2.2±0.2*). Si bien el PRP para medicina regenerativa se procesa a 37ºC, es sabido que la activación plaquetaria aumenta a menor temperatura. En concordancia, la proliferación de HMEC-1 inducida por PRP activado a 4 o 23°C fue mayor que a 37°C utilizando PRP puro o diluido (25%) (PRP100%: 4°C=2.9±0.2***&&, 23°C=2.4±0.2**&, 37°C=1.7±0.1*. PRP25%: 4°C=4.2±0.3***&&, 23°C=3.4±0.3***&, 37°C=2.4±0.2**). Este efecto fue asociado a una mayor liberación de VEGF plaquetario (factor proangiogénico) (4ºC=12±1***&&, 23ºC=10±1**&, 7.5±0.6*ng/ml). En conclusión, la activación de PRP a 4°C y posterior dilución del mismo sería más eficiente para la utilización de estos biomateriales con fines regenerativos comparado con los protocolos actuales.

162 (498) CONTRIBUCIÓN DE DIFERENTES MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS A LA TROMBOCITOPENIA EN LA PTI

Paola Lev[1]; Matías Grodzielski[1]; Nora Goette[1]; Ana Glembotsky[1]; Veronica Montero[2]; Marta Pierdominici[3]; Felisa Molinas[1]; Paula Heller[1];Rosana Marta[1]
UE IDIM CONICET[1] CEMIC, Norberto Quirno[2] Hospital Ramos Mejia[3]

Previamente demostramos aumento de apoptosis de plaquetas (PQ) de PTI, así como inhibición de la formación de proplaquetas (FPP=trombopoyesis) de megacariocitos (MK) normales en presencia de plasma de pacientes, debida en parte a la presencia de autoanticuerpos contra antígenos megacariocíticos. En este trabajo estudiamos el efecto del plasma de PTI sobre el desarrollo de MK a partir de progenitores hematopoyéticos (megacariopoyesis) con el objetivo de evaluar la contribución de estos tres mecanismos en la trombocitopenia en nuestra cohorte de pacientes. Se estudiaron 23 pacientes diagnosticados de acuerdo a los criterios actuales (recuento de PQ, 35±17x10^9/L). Para evaluar si los plasmas de PTI tenían algún efecto sobre la megacariopoyesis normal, se obtuvieron progenitores CD34+ de sangre de cordón umbilical, cultivados con 10% de plasma recalcificado de pacientes o controles durante 12 días. Se analizó el nº de células totales, MK totales (CD61+) y la expresión de CD42b (marcador de madurez de MK).Los cultivos incubados durante 12 días con plasma de PTI produjeron un nº mayor de células totales, MK totales y células CD42b+, respecto a los incubados con plasma normal (test t con corrección de Welch, p=0.036, 0.037 y 0.038, respectivamente) 3 de 23 muestras de PTI dieron valores superiores al rango normal. La FPP estuvo inhibida en presencia de 12 de 23 plasmas de PTI. Catorce de 23 pacientes tuvieron aumento de apoptosis de PQ. Se observó inhibición de FPP conjuntamente con apoptosis de PQ en 7 de las 23 muestras. Contrariamente a lo descripto, la megacariopoyesis fue normal o aumentada en presencia de plasma de PTI. La inhibición de la FPP indicaría que la disminución de la producción de PQ ocurre en la etapa final de formación de las mismas y no durante el desarrollo megacariocítico. La coexistencia de inhibición de FPP y apoptosis de PQ refuerza la idea de que más de un mecanismo patológico podría contribuir a la trombocitopenia en un mismo paciente.

163 (636) FUNCIÓN RENAL EN EL BALANCE DEL HIERRO

Gisela Giorgi[1]; Norma María Giusto[2]; Marta Elena Roque[1]
Laboratorio de Fisiología Humana, INBIOSUR,Universidad Nacional del Sur[1] INIBIBB[2]

El riñón cumple funciones en la homeostasis del hierro. Estudios de nuestro laboratorio identificaron en deficiencia de hierro proteínas que participan en la restauración de la anemia como Prohepcidina, Ferroportina y Transportador de Metales Divalentes1 (DMT1). Para avanzar en el conocimiento de proteínas que movilizan hierro renal se estudiarán DMT1, ZIP14 (SLC39A14), Receptor de Transferrina (RTf) y Hepcidina en modelos animales. Materiales y Métodos. Ratones CF1(N=12/modelo,n=6/grupo, diseño pareado) en Modelos de*:1)Sobrecarga de Fe(SCFe)*: FeSacarato ip (1,3g/kg);*2*)Deficiencia de Fe (DFe): flebotomía con anestesia (5ds/30ds);3)

Hipoxia normobárica:(8,5%O_2- 91,5%N2/12dias); Controles de los tres modelos.IHQ:anti-DMT1,-ZIP14,-RTf,-Prohepcidina,-ferritina. WB:anti-DMT1/anti-rabbit. *Bioética:* CICUAE-UNS CDBBF791/14:026/2014, 027/2014) Estadísica: p<0,05. Test t-student .Resultados: En corteza fue leve la inmunoreactividad de DMT1 y RTf en TPS2. Por WB se observó disminución de DMT1 (p<0,05). ZIP14 mostró intensa inmunomarcación apical en TPS1-S2. La expresión de Ferritina y Prohepcidina fue evidente en TPsS1 y S2. En médula interna (MI) DMT1y RTF no mostraron cambios, siendo evidente la inmunomarcación de Prohepcidina. *DFe: e*n corteza, DMT1 y RTf mostraron localización apical en S2 y S3. La expresión de Prohepcidina fue débil en S2. En MI, la expresión de DMT1 fue intracelular. *Hipoxia:* en corteza, DMT1 y RTf se localizó en la membrana apical del epitelio tubular S2 y S3. La expresión de Prohepcidina celular fue débil en TPS2 y MI. El cambio de localización celular de DMT1 y RTf en hipoxia y deficiencia de hierro podría explicar la función de estas proteínas en la captación tubular de hierro en alta demanda. En sobrecarga de hierro fue evidente el rol del importador ZIP14 en la captación del hierro. Concluimos que el riñón contribuiría a la homeostasis del hierro en estados de alta y baja demanda, por la acción coordinada del eje Hepcidina-DMT1-RTf-ZIP14

FARMACOLOGÍA 1

164 (4) EFECTO DEL FITOESTRÓGENO GENISTEÍNA (GNT) SOBRE LA RESISTENCIA A MULTIDROGAS EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA

Juan Pablo Rigalli[1]; Guillermo Nicolás Tocchetti[1]; Maite Rocio Arana[1]; Silvina Stella Maris Villanueva[1]; Johanna Weiss[2]; Viviana Alicia Catania[1]; María Laura Ruiz[1]
IFISE[1] Universität Heidelberg[2]

El cáncer de mama afecta a 1,4 millones de mujeres al año. El 25% de las pacientes presenta resistencia a la quimioterapia, en parte por sobreexpresión de proteínas de resistencia a multidrogas que median el eflujo de agentes citostáticos. GNT es un fitoestrógeno presente en la soja con capacidad de inducir transportadores de drogas. Se desconoce si tal efecto ocurre en cáncer de mama. Se trataron células MCF-7 y MDA-MB-231 con GNT (0,1-10μM, 48 h) o vehículo (C) y se evaluó: 1-expresión proteica (por inmunoblot) de P-glicoproteína (P-gp), proteína asociada a resistencia a multidrogas 1 (MRP1) y proteína de resistencia del cáncer de mama (BCRP); 2-eflujo y resistencia a doxorubicina (DOX) y mitoxantrona (MXR), sustratos de los transportadores (por citometría de flujo y tinción con cristal violeta); 3-mecanismo molecular: a-expresión de transportadores a nivel de ARNm por qPCR; b-presencia de un mecanismo traduccional (coincubación con cicloheximida, CHX). Los resultados se expresan como media ± SD (n=3-4, p<0,05). En MCF-7, GNT (10μM) indujo la expresión proteica de MRP1 y BCRP (121 y 381%, respectivamente) y aumentó el eflujo de DOX y MXR (55 y 136%, respectivamente). El incremento del eflujo fue prevenido por inhibición de BCRP confirmando un rol prevalente de tal transportador. Las células pretratadas con GNT 10 μM mostraron mayor resistencia a DOX (IC50: 1,3±0,1μM vs C: 0,3±0,1μM) y a MXR (IC50: 3,5±0,8μM vs C: 2,0±0,7μM). En MDA-MB-231 se observó inducción de MRP1 (70 y 74%) por GNT 0.1 y 1μM, respectivamente, sin embargo, no se asoció a mayor eflujo o resistencia a DOX o MXR. Ninguna de las inducciones observadas a nivel proteico en ambas líneas se asoció a aumento de ARNm, sugiriendo un mecanismo no transcripcional. Todas las inducciones fueron prevenidas por CHX, evidenciando un mecanismo traduccional. Los resultados sugieren una menor eficacia de la quimioterapia del cáncer de mama en pacientes expuestas a GNT, en especial de fármacos sustratos de BCRP.

165 (22) IN VIVO EFFECTS OF METFORMIN AGAINST ECHINOCOCCUS GRANULOSUS LARVAL STAGE

Julia A Loos[1]; Daniela* Drago[2]; Claudia Del Carmen* Melucci Ganzarain[2]; Valeria A* Dávila[2]; Christian Rodríguez R[1]; Andrea C Cumino[1]
Conicet - FCEyN, Universidad Nacional de Mar del Plata[1] FCEyN, Universidad Nacional de Mar del Plata[2]

Cystic echinococcosis is a zoonotic infection caused by the larval stage of the cestode *Echinococcus granulosus*. Chemotherapy currently employs benzimidazoles, however 40% of cases do not respond favorably. With regard to these difficulties, novel therapeutical tools are needed to optimize treatment in humans. The aim of this work was to explore *in vivo* the effect of metformin (Met) against *E. granulosus*, due to the fact that in vitro the drug inhibits the survival of *E. granulosus* protoscoleces and metacestodes. We demonstrated the chemotherapeutic and chemopreventive pharmacological effects of the drug. At a dose rate of 50 mg/kg/day, Met induces protection against the infection in mice. In the clinical efficacy studies, a reduction in cyst weight was observed after the administration of 50 mg/kg to mice with cysts developed during four months (0.54 ± 0.10 g), compared to those collected from control mice (1.75 ± 0.2 g). In vitro synergic therapeutic effects were observed in presence of Met plus albendazole (0.07 ± 0.01 g) at low doses (5mg/kg day of ABZSO), suggesting the importance of chemoprophylactic and clinical efficacy studies combining Met with conventional anti-echinococcal agents to test the potential use of this drug in hydatidosis therapy. P-glycoprotein expression was investigated and since Met was detected into murine cysts (0.2 to 0.5 μg Met/g wet weight of cyst), we analyzed the genome occurrence OCT1/OCTN1 orthologs in *Echinococcus sp.* We identified five putative OCT1/OCTN1 of which OCT A, B, D and E were expressed in protoscoleces and metacestodes allowing the accumulation of the drug in parasitic tissues. Possible mechanisms for the susceptibility of metformin are discussed in relation to dual metabolic control of parasite and host.

166 (30) INDUCCIÓN DE ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO, AUTOFAGIA Y MUERTE CELULAR POR BORTEZOMIB EN LOS ESTADIOS LARVARIOS DE ECHINOCOCCUS GRANULOSUS. M

M. Celeste Nicolao; Andrea C. Cumino
CONICET - FCEYN, Universidad Nacional de Mar del Plata

El bortezomib (Bz) es un ácido borónico dipeptídico, que inhibe la actividad proteolítica de la subunidad β5 del proteasoma 26S e induce la muerte celular en varios tumores celulares. Bz es un fármaco aprobado por la FDA, cuyo mecanismo de citotoxicidad aún no está completamente dilucidado. En este trabajo, se ha determinado el impacto de la inhibición in vitro del proteasoma sobre la viabilidad de los estadios larvarios de Echinococcus granulosus (Eg, agente causal de la hidatidosis humana) y su relación con la autofagia. El Bz inhibe la viabilidad de los protoescólices (PTS) y metacestodes (MTC) de manera dosis dependiente, observándose un efecto significativo con 5 μM y 0,1 μM luego de 24 h, respectivamente. Además, se encontró un efecto sinérgico sobre la viabilidad de ambos estadios larvarios utilizando una combinación de Bz más el inductor autofágico rapamicina. Mediante RT-PCR y qPCR se comprobó la inducción de estrés de retículo endoplásmico en PTS tratados con Bz, observándose sobreexpresión del ARNm de las chaperonas calnexina y grp-78 respecto a los controles. La inducción de autofagia fue estudiada mediante expresión de genes (atg6, atg8, atg12 y atg16) por RT-PCR y qPCR en ambos estadíos larvarios encontrándose un aumento de la expresión de estos genes en PTS y de atg-8 en MTC. Además, mediante ensayos de Western Blot e inmunodetección in toto se determinó la sobreexpresión de la proteína marcadora de autofagia LC3 en PTS tratados con Bz respecto a los controles. La localización de dicha proteína fue observada en el tegumento, ventosas y en el sistema excretor de PTS. Estos resultados muestran que, el bloqueo del proteasoma y la inhibición del plegamiento de las proteínas podrían dar lugar a estrés del retículo endoplásmico, favoreciendo la muerte celular por autofagia en los estadios larvarios de Eg, lo que contribuye a la identificación de nuevas dianas terapéuticas para la quimioterapia de la hidatidosis.

167 (31) LA OVEJA COMO MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEONECROSIS MAXIMAR ASOCIADA AL USO DE AMINOBISFOSFONATOS (ONMBPS)

Susana Noemi Zeni[1]; Mario Davison[2]; Leandro Lyardet[2]; Maríana Preliasco[2]; Graciela Yaful[3]; Perla Torres[3]; Gretel Pellegrini[1]
INIGEM[1] Facultad de Odontologia. Universidad Nacional de Rio Negro[2] Facultad de Veterinaria. Universidad Nacional de Rio Negro[3]

Una de las reacciones secundarias por el tratamiento crónico con bisfosfonatos, especialmente los más potentes es la ONM-BPs, posiblemente por la intensa reducción del remodelamiento óseo que se produce por dicho tratamiento. Objetivo: Desarrollar un modelo experimental de ONMBPs en ovejas debido a que su tamaño permite realizar manipulaciones en la cavidad bucal, evaluando los cambios del remodelamiento óseo y masa ósea maxilar por el tratamiento durante 2 años con zolendronato (ZOL) en dosis equivalente al utilizado en neoplasias. Métodos: Se utilizaron 12 ovejas hembras adultas (9 OVX y 3 SHAM) de la raza Corriedale; 6 OVX recibieron ZOL, las otras 6 (3 OVX y 3 SHAM) recibieron solución fisiológica. Al año, se extrajo el primer molar y cresta iliaca. Al 2do. año se realizó un implante dental y contralateralmente un relleno óseo con material comercial (Bio-Oss); en el material extraído se determinó contenido de Ca y P. Se evaluó microbiológicamente el contenido de levaduras. Al sacrificio se evaluó calcemia (sCa), fosfatemia (sP), crosslaps (CTX) y fosfatasa alcalina ósea (FAO) en suero y se evaluó densitométricamente el contenido mineral óseo de la hemimandíbula superior (CMO). Resultados expresados en el siguiente orden SHAM, OVX Y ZOL. sCa (mg/dl): 9.1±0.8; 9.0±0.5; 8.9±0.4; sP (mg/dl): 4.63±0.21; 4.37±0.22; 3.96±0.36; FAO (mg/dl): 50.3±2.5; 58.3±0.6; 54.0±4.3; CTX; 644±8.7a; 826±83b; 271±57c; Ca (g/g tejido): 0.707±0.263a; 0.443±0.049b; 0.537±0.048c; P (g/g tejido): 0.290±0.084; 0.208±0.011; 0.211±0.048; CMO mandíbula (g/cm2): 32.1±9.2a; 24.0±6.1b; 42.3±3.0c. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$). La sobrevida de los grupos SHAM y OVX fue del 100%, del grupo ZOL 77% (2 murieron); se observó necrosis de mandíbula por Actinomices en 2 ZOL (33%). El sCa y FAO no presentaron diferencias entre los grupos; existió tendencia a menor sP en el grupo ZOL respecto de SHAM y OVX, sin diferencias entre ellos. Respecto de las SHAM: al año, la resorción aumentó en OVX y disminuyó en ZOL; el contenido de Ca en la mandíbula disminuyó en OVX; en ZOl se previno parcialmente la disminución; a los 2 años, la CMO fue significativamente menor en OVX y mayor en ZOL ($p<0.01$). Conclusiones: el tratamiento crónico con altas dosis de ZOL redujo notablemente la resorción y aumentó la masa ósea e indujo necrosis en el 33% de los casos, por lo cual fue posible generar un modelo experimental de ONMBPs por Tesis doctoral Odont. R.Davison. Universidades de Rio Negro, de Buenos Aires, CONICET y PICTO-2010-0181.

168 (43) RESPUESTA ADAPTATIVA AL ESTRÉS OXIDATIVO CAUSADO POR BENZNIDAZOL (BZL) EN LA LÍNEA CELULAR HEPÁTICA HEPG2. PARTICIPACIÓN DEL FACTOR 2 ASOCIADO AL FACTOR NUCLEAR ERITROIDE 2 (NRF2) Y DE LA PROTEÍNA ASOCIADA A RESISTENCIA A MULTIDROGAS 2 (MRP2)

Juan Pablo Rigalli[1]; Virginia Gabriela Perdomo[1]; Nadia Ciriaci[1]; Daniel Eleazar Antonio Francés[1]; María Teresa Ronco[1]; Amy Bataille[2]; María Laura Ruiz[1]; José Enrique Manautou[2]; Viviana Alicia Catania[1]
IFISE[1] University of Connecticut[2]

BZL es la única droga disponible para el tratamiento del mal de Chagas en áreas endémicas. Si bien su uso se asoció a estrés oxidativo, no hay estudios al respecto en modelos de hepatocitos humanos ni con concentraciones similares a las que podrían estar expuestos debido a la administración oral de BZL. En el presente trabajo se trataron células HepG2 con BZL (200 µM; 15 min 1, 3, 12, 24 y 48 h) y se determinaron los niveles de ROS y su mecanismo de detoxificación. Los resultados se expresan como la media ± SD (n=3, $p<0.05$). BZL aumentó ROS intracelulares (oxidación de DCFH2) a 1 y 3 h de exposición (40 y 57%, respectivamente), normalizándose a 24 h. La relación glutation oxidado:total (GSSG:GSH+GSSG) aumentó a 1, 3 y 24 h (31, 37 y 43%, respectivamente) debido al incremento del GSSG. A 12 y 24 h se determinaron las actividades de diversas enzimas antioxidantes y sólo se observó un aumento significativo en glutation peroxidasa (66%) a las 12 h, explicando la disminución de ROS y el aumento de GSSG. Se cuantificó el eflujo de GSSG al medio de cultivo a las 24 y 48 h de exposición, observándose un aumento (69 y 84%, respectivamente) que explica la normalización de la relación GSSG:GSH+GSSG a 48 h. La expresión de MRP2 (inmunoblot) fue inducida por BZL a 24 y 48 h (68 y 75%, respectivamente). La mediación de Nrf2 en la inducción se evaluó midiendo su translocación al núcleo. Se observó mayor translocación a 24 y 48 h (204 y 89%, respectivamente). El rol de Nrf2 se verificó evaluando el efecto de BZL (200 mg/kg día, durante 3 días, i.p.) sobre la expresión de Mrp2 hepática (por qPCR) en ratones Nrf2+/+ y Nrf2-/-. BZL indujo Mrp2 en Nrf2+/+ (194%) no así en ratones Nrf2-/-. En conclusión, se corroboró la generación de ROS a una concentración de BZL similar a la que se alcanzaría en hígado. Su detoxificación se debe al incremento de la actividad glutation peroxidasa y de MRP2, siendo Nrf2 un mediador clave del mecanismo compensador.

169 (406) NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS: ESTUDIO DE HEMOCOMPATIBILIDAD Y EFECTO SOBRE CÉLULAS ENDOTELIALES

Adrian E Campelo[1]; Mariela A Agotegaray[2]; Verónica Lassalle[2]; Virginia L Massheimer[1]
INBIOSUR[1] INQUISUR-CONICET, Dpto. de Química, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, ARGENTINA.[2]

El uso de nanopartículas magnéticas (NPMs) para el transporte dirigido de fármacos mediante aplicación de un campo magnético encuentra aplicaciones promisorias en biomedicina. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de NPMs de magnetita recubiertas con quitosano y cargadas con Diclofenac (Dic) formuladas en nuestro laboratorio, sobre células sanguíneas y células endoteliales vasculares (CE). Las NPMs se obtuvieron mediante nanoprecipitación y encapsulamiento; se caracterizaron por difracción dinámica de la luz (medida del diámetro hidrodinámico Dh), microscopía electrónica de transmisión y espectroscopia UV para cuantificar el Dic. Cultivos de CE de aorta de rata fueron expuestos a 48 hs de tratamiento con dos formulaciones de NPMs (con y sin Dic) en concentraciones de 1, 10 y 100 µg/ml. La viabilidad celular se estudió mediante la técnica del MTT y por la capacidad de producir NO (reacción de Griess) al ser tratadas con Acetilcolina (ACh). Los ensayos de hemocompatibilidad se desarrollaron tratando muestras sanguíneas con 1, 10 y 100 µg/ml de NPMs. Se evaluó morfología de células sanguíneas, hemólisis, velocidad de sedimentación globular y agregación plaquetaria (AP). Las NPMs monodispersas presentaron un Dh de 80±10 nm y forma esférica (TEM). No se observaron cambios en la viabilidad de CE (MTT) en las dosis más bajas de NPMs. La producción basal de NO a las dosis estudiadas de NPMs no se vio afectada y no se detectaron diferencias significativas en el efecto de ACh sobre la producción de NO (3,6±0,25; 6,6±0,31 6,3±0,33 nmoles NO/ml Cont; ACh; NPMs+ACh $p<0,01$). Los parámetros hematológicos resultaron normales en dosis de 1 y 10 µg/mL. El tratamiento con 100µg/mL produjo alteraciones de la morfología de la membrana de los eritrocitos y una disminución de la AP de 80±5% y 82±4% (Con y sin Dic vs AP basal $p<0,05$). Los resultados sugieren que las NPMs obtenidas no producen alteraciones en la funcionalidad de CE y son hemocompatibles en dosis de 10 µg/mL.

CARDIOVASCULAR 2

170 ESTE TRABAJO FUE RETIRADO

171 (53) EFECTO DE LA EDAD Y LA EXPOSICIÓN AGUDA A LA ALTURA SOBRE LA CARDIOPROTECCIÓN Y

ESTIMULACIÓN β-ADRENÉRGICA. ROL DEL ÓXIDO NÍTRICO

Pablo H La Padula[1]; Melisa Etchegoyen[1]; Analia Czerniczyniec[2]; Silvia Lores-Arnaiz[2]; Moriondo Marisa[1]; Paglia Nora[1]; Jose Milei[1]; Lidia E. Costa[1]
ININCA[1] IBIMOL[2]

Se evaluó el rol del óxido nítrico endógeno (NO) en la modulación de la contractilidad en condiciones basales, de estimulación β-adrenérgica, y de hipoxia/reoxigenación (H/R) en músculos papilares aislados (MP) de ventrículo izquierdo (VI) de ratas de 1 y 3 meses sometidas a 58.7 kPa en una cámara de hipopresión durante 48 h (HH) y de sus controles a 101.3 kPa (C). Ambos MP de cada rata se estudiaron paralelamente, uno suplementado con sustrato de la NO sintasa (NOS) L-arginina (arg) 2 mM para evaluar la máxima producción fisiológica de NO, y el otro con el inhibidor L-NNA 2 mM (inh). Se determinó secuencialmente, en condiciones isométricas, la tensión desarrollada (TD), luego de la adición de arg o inh, en respuesta a isoproterenol 10-4 M (ISO), y durante 60/30 min de H/R. Los resultados se expresan en% respecto al tratamiento previo. En C1 la respuesta a ISO fue 196±28 vs. 118±10 y la recuperación de TD pos H/R fue de 99±8 vs. 53±9, para L-arg e inh respectivamente, P< 0.01. Esta modulación por NO se perdió en el grupo C3. El grupo HH1 no mostró modulación de la respuesta a ISO ni cardioprotección por NO, efectos que sí se pudieron observar en el grupo HH3: 164±9 vs. 145±3 (respuesta a ISO) y 70±4 vs. 54±1 (recuperación pos H/R) para arg e inh, respectivamente, P< 0.05. La expresión de nNOS en VI fue en C1 34% superior a HH1, mientras que en C3 fue 59% inferior a HH3, P< 0.05. La exposición aguda a la altura no modificó la presión arterial. Conclusión: el NO, a través de la modulación del sistema β-adrenérgico, tendría un rol en la cardioprotección observada en animales normóxicos de 1m, efecto que se anularía con la edad. En cambio, luego de la exposición aguda a la altura simulada, el efecto del NO sobre la modulación β-adrenérgica y cardioprotección se hizo efectivo sólo en las ratas de 3m. El presente trabajo evidencia una sinergia entre los sistemas β-adrenérgico y del NO que podría utilizarse para el establecimiento de un modelo de cardioprotección.

172 (129) MECANISMOS QUE INTERVIENEN EN LA ACTIVACIÓN DEL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO REMOTO

María Ailín Goyeneche[1]; Martín Donato[1]; Timoteo Marchini[2]; Virginia Pérez[1]; Julieta Del Mauro[3]; Christian Höcht[3]; José Manuel Rodríguez[1]; Pablo Evelson[2]; Ricardo J. Gelpi[1]
Instituto de Fisiopatología Cardiovascular. Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.[1] IBIMOL[2] Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.[3]

El precondicionamiento isquémico remoto (PCr) es un fenómeno por el cual, breves ciclos de isquemia-reperfusión (I/R) de un órgano alejado del corazón, reducen el tamaño del infarto de miocardio producto de un episodio de isquemia prolongado. El objetivo fue determinar, antes de la isquemia miocárdica, algunos de los mecanismos intracelulares responsables de activar el PCr. Se estudió la participación de los receptores muscarínicos, la enzima Akt, la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), los canales de K^+_{ATP} mitocondriales (mK^+_{ATP}) y la función mitocondrial considerando la producción de H_2O_2. Corazones de ratas Wistar fueron aislados y perfundidos según la técnica de Langendorff y sometidos a 30min de isquemia/120min de reperfusión (I/R, n=8). En un segundo grupo (n=9), se repitió el protocolo anterior pero, previo al aislamiento del corazón y con el animal anestesiado, se realizó un protocolo de PCr (3 ciclos de 5 min I/R de la arteria femoral). En 4 grupos adicionales, previo al PCr, se realizó vagotomia bilateral (n=7, VS), se administró atropina (n=6); L-NAME (n=8, inhibidor de la síntesis de ON) y 5-HD (n=5, bloqueante de mK^+_{ATP}). Se midió el tamaño de infarto, se evaluó la expresión de Akt y eNOS y la producción mitocondrial de H_2O_2. En el grupo I/R el infarto fue de un 49.5±4.5%. El PCr disminuyó el tamaño del infarto a un 30.6±2.8% (p<0.05). La vagotomía bilateral y la atropina, abolieron el efecto del PCr (53.2±4.2 y 51.1±3.8%). Los mismo se observó con L-NAME (49.1±1.8%) y 5-HD (53.1±4.2%). El PCr aumentó la fosforilación de Akt y eNOS (p<0.05) y este efecto fue abolido por VS. El PCr incrementó la producción mitocondrial de H_2O_2 un 27% (p<0.05), respecto de I/R. El PCr reduce el tamaño del infarto a través de la activación de los receptores muscarínicos, la fosforilación de la Akt y eNOS, la apertura de los mK^+_{ATP} y la liberación de H_2O_2 por la mitocondria. Estos fenómenos ocurren previo a la isquemia miocárdica, actuando como "estímulos" del PCr.

173 (191) ¿LOS FÁRMACOS ANTIOSTEOPORÓTICOS AFECTAN LA SALUD VASCULAR?: EFECTOS DEL RANELATO DE ESTRONCIO SOBRE EL ENDOTELIO

Pablo H Cutini; María B Rauschemberger; Adrián E Campelo; Sabrina B Cepeda; Marisa J Sandoval; Virginia L Massheimer
INBIOSUR

El ranelato de estroncio (RSr) es un fármaco empleado para reducir el riesgo de fracturas en individuos con osteoporosis. Resultados recientes muestran que pacientes bajo tratamiento con este compuesto presentan mayor riesgo de sufrir enfermedad cardiovascular. Por tal motivo, evaluamos los efectos del RSr sobre eventos moleculares y celulares que participan en el inicio y progresión de la lesión vascular. Como sistema experimental empleamos anillos de aorta de ratas Wistar jóvenes (RASj) y seniles (RASs) y cultivos primarios de células endoteliales (CE) y células musculares lisas vasculares (CMLV). Se evaluó el efecto de RSr sobre la producción de óxido nítrico (NO) por el método de Griess. En RASj y RASs, el compuesto antiosteoporótico inhibió la síntesis del vasoactivo a 20 min de tratamiento (0.620±0.04 vs 0.310±0.08; 0.339±0.02 vs 0.220±0.06; control vs RSr 1mM; RASj vs RASs, p<0.01). Se observó un comportamiento similar en cultivos de CEj y CEs (↓40% y ↓32% s/c; 20 min trat., p<0.05). Resultados semejantes se obtuvieron luego de 30 min de tratamiento. La síntesis de NO es un evento importante en la regulación de la agregación plaquetaria (AP). Mediante método turbidimétrico evaluamos, en primera instancia, los efectos del RSr sobre la AP dependiente de endotelio, en RASj y RASs. El fármaco estimula la agregación de plaquetas a diferentes tiempos (RASj: 45% y 90%; RASs: 40% y 70% s/c, 20 y 30 min trat., p<0.05). CEj y CEs mostraron el mismo patrón de comportamiento en cuanto a los porcentajes de AP (46%, 72% s/c CEj; 42%, 61% s/c CEs; 20 y 30 min trat. resp., p<0.02). En tanto, el RSr no evidenció cambios significativos en otros eventos moleculares y celulares relevantes en regulación de la función vascular como producción de VEGF y migración de CE y CMLV. En conclusión, los resultados sugieren que, en nuestro sistema experimental, independientemente de la edad de los animales estudiados, el RSr parece no ejercer efectos beneficiosos para la salud vascular.

174 (432) IMPLICANCIA DE LAS CADENAS DE GLICOSAMINOGLICANOS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EN LA "ATERO-RESISTENCIA" VASCULAR

Roxana Elena Oberkersch[1]; Rita Yanina Rasente[1]; Benjamín Barakian[1]; Florencia Funez[1]; Sonia Yuschak[2]; Nicola Volpi[3]; Graciela C Calabrese[1]
Facultad de Farmacia y Bioquímica[1] Servicio de Obstetricia del Complejo Médico Churruca- Visca[2] Universidad de Modena-Reggio Emilia, Italia[3]

Hemos reportado cambios en la producción de los proteoglicanos (PGs) de la matriz extracelular vascular frente a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), relacionados con la atero-susceptibilidad y atero-resistencia endotelial. El desafío del presente trabajo fue evaluar la secreción de estos PGs y las características estructurales de sus cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs), en un endotelio "atero-resistente"; y la expresión de las enzimas asociada con su síntesis: N-acetilgalactosaminatransferasa-2(ChGn-2) y condroitín-4-O-sulfotransferasa-1(C4ST-1).Las células HUVEC fueron tratadas con VLDL-típicas (0, 75 y 100µg/mL);los PGs aislados del medio de cultivo fueron estudiados por:(1)Western blot y (2) HPLC. La expresión de las enzimas fue estudiada por RT-PCR. El tratamiento con 75µg/mL de lipoproteína produjo un aumento significativo en

la secreción de versicano y decorina (P<0,05; n=3); mientras que frente a 100µg/mL se observó un descenso de decorina y biglicano (P<0,05; n=3). Este patrón fue acompañado por cambios en la relación de sus cadenas de GAGs: condroitín sulfato/dermatán sulfato (CS/DS) (38,5±15,0; 388,0±20,0; 86,5±20 ng/mL; 0, 75 y 100 µg/mL de VLDL, P<0,05; n=3). Paralelamente, se detectó un aumento en la densidad de carga negativa de las cadenas de GAGs (P<0,05; n=3); con un cambio en el patrón de sulfatación expresado por un incremento en la relación 4S/0S (4,88±0,13;13,97±1,8;14,53±11,46 ; 0, 75 y 100 µg/mL de VLDL, respectivamente, n=3). Sin embargo, no se detectaron cambios en los niveles de mRNA de las enzimas. Los resultados obtenidos sugieren que el endotelio de características "atero-resistentes" es capaz de reaccionar frente a la injuria por VLDL modificando no sólo los patrones de expresión sino además las características de sulfatación de los CS-DS PGs. El estudio de las enzimas involucradas abre el camino para nuevas estrategias de diagnóstico y tratamiento de la ateroesclerosis.

175 (435) LA PERDIDA DE DISTROFINA INTERVIENE EN LA REGULACIÓN DE LA RIGIDEZ MIOCARDICA EN UN MODELO DE SOBRECARGA DE PRESIÓN

Diamela T Paez[2]; Martin Donato[2]; Bruno Buchholz[2]; Eliana Cicale[3]; Laura Valdez[1]; Tamara Zabornyj[1]; Alberto Boveris[1]; Ricardo J. Gelpi[2]
IBIMOL[1] Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Dpto. Patología, Facultad de Medicina, UBA[2] Bioterio, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires[3]

En corazones con hipertrofia ventricular izquierda (HVI), dilatación e insuficiencia cardiaca existe degradación de proteínas del citoesqueleto y asociadas al sarcolema, como la distrofina. Objetivo: Evaluar la expresión de distrofina y su relación con la función diastólica en un modelo de HVI por sobrecarga de presión sin dilatación. Ratones FBV fueron sometidos a una cirugía simulada en la que no se realizó constricción de la arteria aorta (G1, n=11). En el grupo 2 (G2, n=14) se realizó una constricción aórtica supravalvular para inducir HVI; y en el grupo 3 (G3, n=15) se repitió G2 pero los animales fueron tratados con doxiciclina (inhibidor de las metaloproteasas por 3 semanas). Luego de 3 semanas post-cirugía se realizó ecocardiograma, cateterismo cardiaco, se determinó expresión de distrofina y consumo de oxígeno mitocondrial en estado 3 y 4 (mitoMVO_2). No existieron diferencias significativas en el diámetro de fin de diástole, ni en la fracción de eyección. En G2 (4.03±0.07) y en G3 (4.50±0.12) hubo un aumento significativo del cociente peso ventrículo izquierdo/peso del corazón, respecto de G1 (3.29±0.01). Se observó una alteración en la relajación ventricular en G2 que no fue modificada por la doxiciclina. La rigidez miocárdica (estrés de fin de diástole/diámetro de fin de diástole) aumentó en G2 a 3.2±0.6 (p<0.05), respecto de G1 (1.3±0.2). El tratamiento con doxiciclina atenuó este incremento (1.72±0.28). El mitoMVO_2 tanto en estado 3 como en 4 se redujo significativamente en G2. El tratamiento con doxiciclina previno este efecto deletéreo. La HVI indujo una degradación significativa de la distrofina respecto de G1 y este efecto fue prevenido con doxiciclina. Existió una correlación lineal entre los niveles de distrofina y el valor de rigidez miocárdica (y=-4.6x+5.6; R^2=0.54; p<0,05). En conclusión la inhibición de las metaloproteasas, mejora el mitoMVO_2, previene la degradación de distrofina y por lo tanto no se incrementa la rigidez miocárdica.

176 (440) LA SOBREEXPRESIÓN DE TIOREDOXINA-1 MODULA LA ACTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS MITOCONDRIALES Y LAS PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN LA RELAJACIÓN DEL MIOCARDIO ATONTADO

Virginia Perez[1]; Tamara Mazo[1]; Laura Valdez[2]; Tamara Zaobornyj[2]; Anabella Gómez[1]; Alberto Boveris[2]; Verónica D´annunzio[1]; Ricardo J. Gelpi[1]
INFICA, Dpto. Patología, Fac. Medicina, Univ. Buenos Aires[1] Ibimol[2]

La tioredoxina-1 (Trx-1) es un antioxidante que protege frente a la injuria por isquemia/reperfusión (I/R) disminuyendo el tamaño de infarto, y hemos demostrado que atenúa las alteraciones sistólicas y diastólicas de la disfunción ventricular postisquémica (miocardio atontado). El objetivo fue evaluar la actividad de los complejos mitocondriales y la expresión de fosfolamban (PLB) y calcio-ATPasa (SERCa2A) en el miocardio atontado en ratones transgénicos que sobreexpresan Trx-1 y en ratones que sobreexpresan Trx-1 mutada en su sitio activo (DN), comparados con ratones no transgénicos (NTG), (n=5 por grupo). Los corazones fueron aislados, perfundidos (técnica de Langendorff) y sometidos a 15min de isquemia global y 30min de reperfusión. Se midió la actividad del complejo I y IV y la expresión de PLB total, fosforilada (f-PLB) y SERCa2A. Previamente mostramos que la sobreexpresión de Trx-1 mejora la recuperación el consumo de oxígeno mitocondrial, el estado contráctil y la disfunción diastólica del miocardio atontado comparado con los NTG, y que en los DN se exacerba la disfunción diastólica. Actualmente, observamos un aumento de la actividad del complejo I (basal) en el grupo Trx-1 (724±55 vs NTG:585±24 y DN:493±44, nmol.min-1.mg proteina-1, p<0.05), mientras que el complejo IV sólo disminuyó durante la reperfusión en los ratones DN (48,0±1,9 vs DN basal:60,0±4,7, min-1.mg proteina-1, p<0.05). De manera basal se observó un aumento significativo de la f-PLB en el grupo Trx-1 (1,38±0,17 UADO, p<0.05), sin cambios en la reperfusión (1,35±0,13 UADO). En los grupos NTG y DN se observó un aumento de la f-PLB en la reperfusión (NTG:1,76±0,22 vs basal:1,01±0,10; DN:1,35±0,17 vs basal:0,80±0,10, p<0.05), sin cambios en la PLB total y la SERCa2A entre los grupos. Nuestros datos sugieren que la protección de Trx-1 frente al miocardio atontado puede relacionarse con una mejoría en la función mitocondrial y un aumento de f-PLB.

NEFROLOGÍA 2

177 (59) EVALUATION OF THE EXPRESSION ANDFUNCTION OF MEGALIN AND CUBILIN DURING TUBU- LOINTERSTITIAL INJURY INDUCED BY EARLY DIABETIC NEPHROPATHY IN MURINE MODELS OF TYPE 1 (T1DM) AND TYPE 2 (T2DM) DIABETES MELLITUS

Maximiliano Germán Giraud-Billoud[12]; Fernando Ezquer[2]; Javiera Bahamonde[2]; Marcelo Ezquer[2]
IHEM[1] CMR, Facultad de Medicina-UDD-Clínica Alemana[2]

Diabetic nephropathy (DN) is the leading cause of end-stage renal disease. Changes in albuminuria are considered a hallmark of the onset or progression of DN. A decrease in the expression of tubular albumin endocytic transporter megalin/cubilin has been associated to DN, but to date there is not a comprehensive study relating early tubulointerstitial injury (TI) and megalin/cubilin albumin transporters. We evaluated the expression and function of both transporters during TI induced by early DN murine models of T1DM and T2DM. T1DM induction: 8-week-old C57BL/6 mice received 200mg/kg of streptozotocin, and sacrificed 10 weeks later. T2DM induction: male C57BKSdb/db were euthanized at 28 weeks of age. We observed a significant increase of interstitial collagen deposits (T1DM vs normal), accompanied by an increase of -SMA (T1DM vs normal) and Col IV tissue expression (T1DM/T2DM vs normal). T1DM animals showed a significant decrease in body weight during the experiments, while T2DM was increased. Kidney size of T1DM/T2DM was also significantly increased. Albumin and VDBP urinary excretion (ELISA) were significantly increased in both diabetic models. Also, we observed in T1DM a significant decrease in surface expression (IFI), mRNA expression and total amount of protein (WB) of megalin. Only a significant decrease in total cubilin (WB) was observed in T1DM. In T2DM we found only a significant decrease in total megalin (WB). Our results demonstrate that albumin and VDBP urinary excretion are probably associated to a diminished expression of megalin and cubilin in T1DM. In T2DM the malfunction of both transporters apparently are not only associated to a decrease in their expression, therefore other possible mechanisms need to be explored. Future efforts should be directed to enlighten the intracellular mechanisms of endocytic transcytocis of megalin/cubilin receptors and the possible protein shedding from the epithelial surface in DN. Supported by FONDECYT PD#3140024.

178 (237) EL EFECTO DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN HEDGEHOG EN LA PROGRESIÓN DE POLIQUISTOSIS RENAL AUTOSÓMICA DOMINANTE

Elisabet M Oddo[2]; María F Martinez[2]; Luis D Mazzuoccolo[4]; Carolina Muchnik[2]; Rodolfo S Martin[2]; Adriana R Fraga[3]; Pablo J Azurmendi[2]

Lab de Nefrología Experimental y Bioquímica Molecular. Inst de Invest. Médicas A Lanari, UBA[2] Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)[3] Dto de Dermatología, Hospital Eva Perón, Gral. San Martin.[4]

En el cilio primario - organela presente en casi todas las células de mamíferos – funcionan, entre otras, las vías de señalización de Ca++ intracelular y de Hedgehog (HH), las cuales se encuentran alteradas en la poliquistosis renal autosómica dominante (ADPKD) y el síndrome del carcinoma basocelular nevoide (SCBN), respectivamente. En trabajos anteriores hemos mostrado la progresión de la ADPKD en el tiempo y la hiperactivación de la vía HH en tumores basocelulares y en piel sana de individuos SCBN. Estudios experimentales en animales sugieren que la hiperactivación de la vía HH afecta el normal desarrollo renal, pudiendo agravar el fenotipo quístico en modelos de ciliopatías/ poliquistosis. Al no existir estudios en humanos decidimos evaluar el efecto de la activación de la vía HH en la evolución por 10 años de un caso de co-herencia de ADPKD y SCBN - por rama materna y paterna, respectivamente - comparándolo con los valores de 17 pacientes ADPKD estudiados en el mismo rango etario (desde 27±1 hasta 37±1 años). Se analizaron presión arterial (PA), volumen renal total (VRT), filtrado glomerular estimado (FGe), excreción urinaria de albúmina (UACR), proteínas totales (PT) y proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1). En el paciente ADPKD+SCBN, el VRT se encontró por debajo de los percentilos (P) 10 y 15 al inicio y final del estudio, respectivamente, con un crecimiento del volumen comparable al grupo ADPKD. MCP-1 presentó al inicio niveles inferiores (P1), que aumentaron al P75, siendo éste el cambio más pronunciado respecto del grupo ADPKD. PA, FGe, UACR y PT no fueron diferentes vs. ADPKD. La combinación de ambos desórdenes autosómicos dominantes es un evento muy poco frecuente (prevalencia 1 en 46 a 205 millones) que no muestra un agravamiento del fenotipo quístico durante el seguimiento realizado, como los modelos experimentales proponen. Esto indicaría que la progresión de ADPKD no está afectada por la alteración de la vía HH.

179 (243) LAS HORMONAS SEXUALES MODULAN LA TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN DEL CANAL RECTIFICADOR DE POTASIO DE MÉDULA EXTERNA (ROMK) LUEGO DE SU INHIBICIÓN CON GLIBENCLAMIDA: EFECTO SOBRE EL SISTEMA KALLIKREINA-KININA

Alejandro Fabián Celía[2]; Luis Alberto Di Ciano[2]; Darío Guevara[2]; Fernando Raúl Ibarra[23]; Elvira Emilia Arrizurieta[2]; Pablo Javier Azurmendi[2]; Elisabet Mónica Oddo[2]

Lab. de Nefrología Experimental y Bioquímica Molecular, IDIM A. Lanari, UBA[2] Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, UBA[3]

En resultados previos mostramos que el bloqueo del canal rectificador de potasio de medula externa (ROMK) por Glibenclamida (Gli) disminuye la reabsorción de Na+ y la excreción de K+, los niveles de K+ y aldosterona en plasma y de ARNm de Kcjn1 (ROMK-1) en médula renal de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) de ambos sexos. También observamos una menor respuesta de estos parametros con la gonadectomía (Gx). Además, la Gx y la alta ingesta de K+ aumentan la actividad de kallikreina urinaria (KU), por lo cual es de interés estudiar la relación entre el sistema kallikreina-kinina (SKK) y el manejo del K+ en el riñón. En el presente trabajo evaluamos el efecto de Gli sobre KU, mRNAs de Klk1, Kcjn1 y expresión proteica de ROMK-1 en homogenatos de corteza renal, así como el posible rol de las hormonas sexuales en esta respuesta. Se estudiaron ratas SHR de ambos sexos a las 12 semanas de vida, la mitad con Gx al destete. En los 3 días previos al estudio se les administró solución glucosada al 4% con ó sin Gli (10 mg/kgPC) vía oral. Los ARNm de Kcjn1 y Klk1 se determinaron por PCR en tiempo real mediante cuantificación relativa, la abundancia proteica relativa de ROMK-1 por western-blot y la KU en orina de 24 hs por método enzimático. El tratamiento con Gli disminuyó la abundancia proteica de ROMK-1 en hembras intactas y con Gx ($p<0.05$), disminuyendo su ARNm solo en machos enteros (de 0.3±0.06 a 0.1±0.04, $p<0.05$). La KU aumentó en el grupo orquidectomizado (de 15.9±0.7 a 35.4±8.0 nKat/dia/100gPC, $p<0.05$), mientras que el ARNm de Klk1 aumentó en machos enteros (de 0.8±0.34 a 2.3±0.53, $p<0.05$). Estos resultados sugieren que la inhibición de ROMK modula su transcripción y traducción en corteza renal según género y presencia ó ausencia de hormonas sexuales, que podría explicar las diferencias en la excreción urinaria de iones encontrada entre los grupos. A su vez, el SKK renal sería sensible a Gli en machos enteros o Gx, sin afectar las hembras.

180 (284) DIFERENTES RESPUESTAS A LA INHIBICIÓN DE DOPAMINA Y BRADIKININA EN RATAS WISTAR ADULTAS OVARIECTOMIZADAS CON INGESTA ELEVADA DE SODIO

Luis A Di Ciano[1]; Sandra Vlachovsky[1]; Gisele Moirón[1]; Pablo Azurmendi[1]; Elisabet Oddo[1]; Elvira Arrizurieta[1]; Susana Nowicki[2]; Fernando R Ibarra[13]

Lab. Nefrología Exp. y Bioq. Molecular. Inst. de Invest. médicas A. Lanari, UBA[1] CEDIE, CONICET Hospital De Niños Ricardo Gutiérrez, CABA, Argentina[2] Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, UBA[3]

En trabajos anteriores mostramos que ratas Wistar adultas ovariectomizadas (OVX) tienen una mayor expresión renal de Na+, K+-ATPasa (NKA) total y defosforilada, menor expresión del receptor de dopamina D1 (D1R) y mayor excreción urinaria de kalikreina. Cuando las ratas OVX reciben dieta hipersódica (HS) excretan menos sodio que las intactas (IF) y desarrollan hipertensión sal sensible. El objetivo del presente trabajo es comparar la contribución del D1R y del receptor B2 de bradikinina (B2R) en la regulación del balance hidrosalino en ratas IF y OVX con dieta HS (NaCl 1% en agua de bebida durante 5 días). La OVX fue realizada a los 60 días de vida y fueron estudiadas 90 días post OVX. Las ratas fueron tratadas con un antagonista D1R (SCH 23390, 1mg/kg/día, sc) o con un antagonista B2R (HOE 140, 7µg/100gPC/día, sc) o vehículo, los dos últimos días del experimento. El bloqueo D1R en IF disminuyó la natriuresis (mmol/día/100gPC) de 3.14±0.03 a 1.65±0.09; $p<0.01$, diuresis (ml/día/100gPC) de 11.52±0.6 a 6.13±0.19; $p<0.01$, incrementó la presión arterial de 112±2 a 140±2 mmHg; $p<0.05$ y aumentó la defosforilación de NKA ($p<0.05$). Contrariamente el bloqueo D1R no produjo cambios en OVX. El bloqueo B2R en OVX disminuyó la natriuresis de 2.13±0.24 a 1.48±0.33; $p<0.05$ y diuresis de 8.50±1.66 a 6.22±1.67; $p<0.05$, sin modificar la fosforilación de NKA y no causó cambios en IF. No se observaron cambios en el filtrado glomerular en ninguno de los grupos. Las ratas intactas con dieta HS incrementan la respuesta natriurética del D1R a través de la fosforilación de NKA, mientras que en las OVX el sistema de dopamina renal no responde. Aunque el B2R contribuye a mantener la natriuresis y diuresis en las ratas OVX con dieta HS, no logran mantener el balance, reteniendo sodio. Estos resultados sugieren que las hormonas ováricas modulan la función del receptor D1 de la dopamina y del receptor B2 de bradikinina.

181 (389) REGULACIÓN DE LA PERFUSIÓN RENAL POR DOPAMINA RENAL Y NOS I DURANTE UNA INGESTA ALTA EN SODIO. IMPORTANCIA DEL RECEPTOR D1R

Maríano Esteban Ibarra[1]; M Florencia Albertoni Borghese[3]; Mónica P Majowicz[3]; María C Ortiz[3]; C Fabián Loidl[1]; Manuel Rey Funes[1]; Luis A Di Ciano[2]; Fernando R Ibarra[24]

IBCN[1] Fac. De Medicina\Inst. De Invest. Médicas "Dr. Alfredo Lanari"[2] Fac. de Farmacia y Bioquímica\Cátedra de Biología Celular y Molecular[3] Fac. de Medicina\Departamento de Ciencias Fisiologicas[4]

En trabajos propios y de otros investigadores se observó que durante una ingesta hipersódica (HS) la producción de do-

pamina renal (DA) aumenta y la expresión de NOS I en mácula densa (MD) disminuye. La DA y NOS I están relacionadas con el balance de sodio y la regulación del flujo plasmático renal (FPR) a través de la retroalimentación tubuloglomerular. En este trabajo se evaluó la conexión entre ambos factores para regular el FPR y el filtrado glomerular (FG). Se estudiaron ratas Wistar macho de 250 a 350 g peso corporal. Recibieron por 5 días dieta normosódica (NS, NaCl 0.24%) o HS (NaCl 1%) en agua de bebida. Los dos últimos días fueron tratadas o no con SCH 23390 (SCH) un antagonista específico del receptor D1R de DA (1mg/kg/día, sc). Con la ingesta HS se observó un aumento de la diuresis y natriuresis (ambas p<0.001 vs NS), de la DA urinaria (NS 679±24 vs HS 1504±94 ng/100g pc/d, p<0.001), una disminución del FG (NS 0.61±0.02 vs HS 0.46±0.02 ml/min/100g pc p<0.05), con un descenso de la expresión de NOS I (p<0.05 vs NS), de la actividad de NADPH-diaforasa (NS 46.10±1.80 vs HS 25.10±1.4 DO p<0.001) y de la producción de nitratos + nitritos (NOx, NS 2,04±0,22 vs HS 1.28±0.10 nmol/mg prot, p<0.01). El tratamiento con SCH no cambió estos parámetros en las ratas NS. Sin embargo, en las ratas HS+SCH 23390 disminuyó un 60% la excreción hidroelectrolítica (p<0.001 ambas vs HS), aumentó significativamente FG y FPR (ambos p<0.001, HS+SCH vs HS), mientras que también se incrementaron la expresión de NOS I (HS 0,70±0,03 vs HS+SCH 0.99±0.06 DO, p<0.05), la actividad de NADPH-diaforasa (HS+SCH 49.27±1.92 DO, p<0.001 vs HS) y NOx (HS+SCH 2.27±0.02 nmol/mg prot, p<0.001 vs HS). De acuerdo a los resultados la DA sintetizada en el túbulo proximal y la mayor actividad de NOS I en MD podrían modificar la retroalimentación tubuloglomerular en forma crónica durante una ingesta hipersódica prolongada, interactuando en la regulación del FPR y del FG mediante estimulación del D1R.

182 (525) ALTERACIONES DE SISTEMAS NATRIURÉ-TICOS RENALES EN LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL INDUCIDA POR SOBRECARGA DE FRUCTOSA EN LA DIETA

Nicolás Martín Kouyoumdzian[1256]; Natalia Lucia Rukavina Mikusic[125]; María Cecilia Kravetz[23]; Julieta Sofia Del Mauro[3]; Rouvier. Edgardo[4]; Silvana María Cantu[45]; Hyun Jin Lee[45]; Ana María Puyo[456]; Jorge Eduardo Toblli[16]; Fernandez Belisario Enrique[1256]; Choi Marcelo Roberto[12456]
ININCA -CONICET[1] Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA[2] Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA[3] Cátedra de Anatomía e Histología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA[4] INFIBIOC[5] CONICET[6]

Introducción: existe poca evidencia acerca de la interacción entre la dopamina renal (DA) y el péptido natriurético atrial (ANP) en la fisiopatología de la hipertensión arterial (HTA) inducida por sobrecarga de fructosa (SF) en la dieta. Objetivo: determinar alteraciones en ambos sistemas natriuréticos en este modelo de HTA. Metodología: ratas macho Sprague-Dawley fueron divididas en grupos control (C) y SF (con solución de fructosa 10%P/V para beber), durante 4, 8 y 12 semanas (n=8/grupo/período). En orina de 24 h se midió L-dopa y DA (HPLC), diuresis, sodio y creatinina, y en plasma ANP, triglicéridos, glucemia, colesterol, insulinemia, sodio y creatinina. La presión arterial sistólica (PAS) fue medida por método indirecto. En tejido renal fue medida por Western Blot la expresión del transportador de L-dopa (LAT-2) y de los receptores D1R y NPR-A. Resultados: un incremento de PAS (mmHg, C4:121±8 vs F4:145±1*; C8:130±4 vs F8:161±10#; C12:133±5 vs F12:163±4#) correlacionó positivamente (R^2=0,78; p=0,002) con el cociente urinario L-dopa/DA (C4:0,49±0,05 vs F4:1,90±0,09#; C8:0,53±0,06 vs F8:2,35±0,10#; C12:0,54±0,07 vs F12:2,57±0,20#), lo cual fue acompañado por un incremento en la expresión (unidades arbitrarias) de LAT-2 en corteza (C4:1,00±0,02 vs F4:1,30±0,04*; C8:1,00±0,05 vs F8:1,23±0,09*; C12:1,00±0,06 vs F12:1,40±0,01*) y médula (C8:1,00±0,01 vs F8:1,42±0,02*; C12:1,00±0,01 vs F12:1,46±0,04*) y disminución de la expresión de D1R en corteza (C4:1,00±0,05 vs F4:0,72±0,08*; C8:1,00±0,05 vs F8:0,75±0,07*). Un descenso del ANP plasmático (C8:1,61±0,10 vs F8:1,30±0,08*; C12:1,65±0,32 vs F12:1,04±0,16*) fue acompañado de una caída en la expresión de NPR-A en médula (C4:1,00±0,05 vs F4:0,81±0,02*; C8:1,00±0,04 vs F8:0,80±0,03*; C12:1,00±0,03 vs F12:0,81±0,01*). *p<0,05; #p<0,01 vs C. Conclusión: la SF en la dieta provocó una depresión en ambos sistemas natriuréticos, lo cual constituye un factor esencial en la fisiopatología de HTA en este modelo.

ONCOLOGÍA 3

183 (17) ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS MYST Y KANSL2 EN GLIOBLASTOMA

Nazarena Eugenia Ferreyra Solari[1]; Fiorella Belforte[1]; Lucia Canedo[1]; Joaquin Espinosa[2]; Mario Rossi[1]; Horacio Martinetto[3]; Gustavo Sevlever[3]; Carolina Perez Castro[1]
Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires (IBioBA) - CONICET- Partner Institute of the Max Planck Society.[1] Howard Hughes Medical Institute and University of Colorado.[2] Fundación para la Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia (FLENI).[3]

Cáncer es una enfermedad que predomina en anormalidades genéticas, aunque las modificaciones epigenéticas cumplen un papel protagónico en la adquisición de un fenotipo celular maligno. En glioblastoma (GBM), se han observado distintas alteraciones epigenéticas como son las modificaciones de histonas. Sin embargo, se desconocen desregulaciones en la expresión del complejo MYST (acetiltranseferasa de histonas) así como en la composición de sus subunidades proteícas. Nuestro objetivo fue evaluar la expresión de MYST y KANSL2 (una de las subunidades del complejo) en el modelo de GBM humano. Además, se investigó el efecto del silenciamiento de KANSL2 sobre el comportamiento tumoral, in vitro e in vivo. Se analizó la expresión de MYST y KANSL2, en 8 muestras de GBM humano y tejido normal, por qPCR. Determinamos un aumento de la expresión de KANSL2 en las muestras de tumores humanos con respecto al tejido normal (p=0.02), mientras que para la expresión de MYST no se detectaron diferencias. Se generaron líneas de GBM, U87MG y T98G, estables para el silenciamiento de KANSL2, utilizando 2 shRNA específicos. Se evaluó su efecto in vitro sobre la expresión de MYST mediante qPCR, y sobre la proliferación mediante conteo celular y ensayo de MTT. Asimismo, se evaluó, en las líneas U87MG silenciadas, su efecto in vivo sobre el crecimiento tumoral en ratones NOD/SCID. Los experimentos de silenciamiento mostraron que KANSL2 inhibe la expresión de MYST (U87MG, p=0.008; T98G, p=0.0001) y la proliferación celular (U87MG, p=0.0006; T98G, p=0.009). Además, los ensayos in vivo demostraron que los dos shRNA específicos inhiben el crecimiento tumoral con respecto al shRNA control (shRNA1, p=0.0001; shRNA2, p=0.005). Estos resultados, en conjunto sitúan a KANSL2 como una proteína pro-tumoral necesaria para el crecimiento tumoral del glioblastoma. Apoyado por ANPCyT y FOCEM (COF 03/11).

184 (28) ESTUDIO PRECLÍNICO SOBRE LA ACTIVIDAD RADIOSENSIBILIZANTE DE BCG Y ÓXIDO NÍTRICO EMPLEANDO UN MODELO MURINO DE CÁNCER DE VEJIGA INVASOR

Barbara Patricia Prack Mc Cormick; Denise Belgorosky; Yanina Veronica Langle; Natalia Patricia Balarino; Ana María Eiján; Eduardo Omar Sandes
Instituto de Oncologia Angel H. Roffo

La radioterapia (RT) constituye junto a la quimioterapia la opción terapéutica conservadora en múltiples tumores entre ellos el cáncer de vejiga (CaV). La radioresistencia y el daño sobre el tejido sano, justifican la búsqueda de adyuvantes que optimicen el efecto de la RT. Una característica colectiva del microambiente tumoral asociada a radioresistencia es la hipoxia. El óxido nítrico (NO) posee capacidad radiosensibilizante en hipoxia. El Bacilo Calmette Guerin (BCG) induce producción de NO y genera respuesta inmune innata y adaptativa. Por esto, estudiamos a BCG como posible adyuvante del efecto de la RT en un modelo de CaV murino invasor (MB49-I). *In vitro* en modelos de monocapa en normoxia y de esferoides con centro hipóxico, se ensayó

producción de NO por ensayo de Griess, y radiosensibilización -ensayo clonogénico (RT 8Gy +/- BCG 1mg/ml +/- L-NAME 2mM). *In vivo*, en ratones C57BL/6J con tumor subcutáneo, tratados con BCG (0,2mg intratumor) y/ó RT (3Gy/día, 3v/sem, dosis total=18Gy), se evaluó: crecimiento tumoral, caspasa-3 (wester blot), radiosensibilización, metástasis pulmonares, sobrevida, e incidencia tumoral al inocular en el flanco contra-lateral al tumor tratado. *In vitro*, BCG aumentó el NO en cultivos en monocapa (Crl vs BCG p<0.01) y en esferoides (Crl vs BCG p<0.05) y en estos últimos mostró radiosensibilización (RT=4Gy, Crl vs BCG p<0.05). *In vivo*, BCG mejoró la respuesta a la RT, aumentó caspasa-3 y radiosensibilizó las células tumorales (Crl vs BCG+RT, p<0.01). A su vez, BCG+RT mejoró la respuesta sistémica, a nivel de la presencia de metástasis (Crl 100%, BCG 75%, RT 83%, BCG+RT 50%), el volumen metastásico (Crl vs BCG+RT, p<0.05) y la incidencia tumoral del segundo inoculo (Crl 100%, BCG 60%, RT 100%, BCG+RT 44%). Concluimos que BCG, a través de la producción de NO, presenta efectos radiosensibilizantes en condiciones de hipoxia y aumenta el efecto antitumoral de la RT a nivel de tumores primarios y secundarios de CaV MB49-I.

185 (101) LA ACTIVACIÓN DE HEMOXIGENASA-1 (HO-1) SE ASOCIA CON UN FENOTIPO MENOS INVASIVO EN CÁNCER DE MAMA

Norberto Ariel Gandini; Eliana Noelia Alonso; María Julia Ferronato; María Eugenia Fermento; Diego Javier Obiol; María Marta Facchinetti; Alejandro Carlos Curino
CONICET -INIBIBB- Lab de Biología del Cáncer

Resultados previos de nuestro laboratorio demuestran que HO-1 reduce el crecimiento de los tumores primarios a través de modulación de la apoptosis en el carcinoma mamario (CM). En este trabajo nos propusimos estudiar los efectos de la enzima sobre el proceso metastásico tanto en muestras humanas como en líneas celulares y modelos animales. En biopsias humanas de CM demostramos mediante inmunohistoquímica que existe una correlación positiva entre la expresión de HO-1 y de E-caderina (p=0,0144; test de Spearman) y β-catenina (p=0,0479; test de Spearman). Además evaluamos por RT-qPCR los niveles del ARNm del factor de transcripción Snail y de VEGFA en biopsias humanas de CM. En la línea celular de CM murino LM3 observamos disminución de la expresión de MMP9, NFκβ (p65) y vimentina y aumento de la expresión de E-caderina y β-catenina (p<0,05; Chi cuadrado) luego del tratamiento con hemina (activador farmacológico de HO-1). Se estudió además la actividad de MMP9 por zimografía. Comprobamos que la activación de HO-1 en células LM3 provoca disminución en la migración celular (ensayos de herida; p=0,003, ANOVA) y la invasión celular (ensayos en matrigel; p=0,0001; test de Student). Además observamos reorganización de los filamentos de actina, obteniéndose menos cantidad de células conteniendo fibras de stress luego del tratamiento con hemina (p=0,0436; Chi cuadrado). En un modelo murino de trasplante singeneico de células LM3 demostramos que la activación de HO-1 se correlaciona con disminución del conteo de nuevos vasos sanguíneos (p<0,001; test de Student) y del número de metástasis pulmonares (p<0,0199; test de Student). En conclusión, estos resultados indicarían que HO-1 disminuye los niveles de proteínas relacionadas a la transición epiteliomesenquimática, frenando así la migración e invasión celular e influyendo en el proceso de metástasis. La activación de HO-1 podría contrarrestar el fenotipo invasivo del CM.

186 (110) EFECTO PREVENTIVO DEL AYUNO INTERMITENTE (AI) EN MODELOS DE HEPATOCARCINOGÉNESIS QUÍMICA EN RATA

Juan Pablo Parody[1]; María Paula Ceballos[1]; Ariel Darío Quiroga[1]; Gerardo Bruno Pisani[2]; María De Luján Alvarez[1]; María Cristina Carrillo[1]
IFISE[1] Univ. Nac. de Rosario Fac. de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas[2]

La detección temprana del hepatocarcinoma celular (HCC) permitiría, mediante diferentes tratamientos, mejorar la sobrevida de los pacientes afectados. La dieta tiene un rol en la carcinogénesis y la restricción calórica en diversos modelos previene su evolución. Objetivos: Evaluar un nuevo modelo extendido de hepatocarcinogénesis experimental y analizar los efectos del AI en el desarrollo tumoral. Metodología: Ratas Wistar macho adultas fueron sometidas a un modelo de iniciación-promoción de 6 (IP) o 9 (IPex) semanas para el desarrollo de preneoplasia hepática. Algunos animales recibieron AI durante las 6 semanas (IPA) o en las últimas 3 semanas del tratamiento extendido (IPexA). El grupo control (C) recibió los vehículos de las drogas. Resultados: El AI no afectó significativamente el peso de los animales. Observamos aumentos en los niveles plasmáticos de β-catenina (C:1,33±0,33; IP:7,35±1,18*; IPA:1,53±0,16; IPex:6,12±1,18*; IPexA:8,20±0,14*) y αGPC3 (C:1,32±0,32; IP:4,76±1,90*; IPA:3,78±0,67*; IPex:4,44±1,16*; IPexA:4,09±0,26*). Los hígados IPex presentan diferencias macroscópicas (superficie multinodular de nódulos pequeños) y microscópicas (histoarquitectura alterada por múltiples nódulos con compresión del parénquima normal vecino, pérdida de estructura laminar, fibrosis moderada portal y periportal, ligero infiltrado linfohistiocitario, moderado aumento de conductos biliares. Tinciones con hematoxilina-eosina y Direct Red 80) comparado con los otros grupos experimentales. El porcentaje del tejido ocupado por los focos preneoplásicos (tinción con rGSTP) aumentó en IPex y en menor medida en IPexA (IP:6,16±0,19; IPA:7,44±1,03; IPex:54,64±8,09#; IPexA:28,45±1,13#) (*p<0,05 vs. C; #p<0,05 vs. IP). Conclusión: El modelo IPex representa una etapa temprana del HCC que favorecería su detección por marcadores tumorales séricos así como también su diagnóstico por imágenes. El AI aplicado en este modelo previene el daño hepático y el avance del proceso carcinogénico.

187 (112) PRESENTE Y FUTURO DE ENSAYOS CLÍNICOS ASOCIADOS AL DESARROLLO DE TERAPIAS CONTRA EL CÁNCER COLORRECTAL

Sabina Palma; Ariel O. Zwenger; Mara V Croce; Martn C Abba; Ezequiel Lacunza
CINIBA (Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas)

El cáncer colorrectal (CCR) es una enfermedad heterogénea a nivel molecular, lo cual explicaría por qué algunos pacientes responden y otros no a un mismo tratamiento. Mediante el análisis integrado de perfiles de expresión génica y alteraciones genómicas se han reportado recientemente subtipos moleculares de CCR. Estos son considerados en ensayos clínicos (EC) para estratificar subgrupos homogéneos de pacientes que se beneficien ante una terapia en particular, evitando el sobretratamiento y reduciendo los efectos adversos. Debido a que los EC constituyen la antesala a las terapias estandarizadas, el objetivo del presente trabajo fue establecer el estado actual de los mismos a partir de su revisión y clasificación por un método no supervisado, a fin de predecir las estrategias terapéuticas futuras en el CCR. Se seleccionaron 352 EC asociados a CCR provenientes de la base de datos Clinicaltrials.gov. Involucraron un total de 110 drogas. Se construyó una matriz binaria de estudios vs drogas. Se empleó la suite MeV para su análisis. Para el agrupamiento jerárquico (HCl) se empleó la distancia euclideana como métrica y el enlace completo como método. Siguiendo una estrategia divisiva de arriba hacia abajo, el HCl clasificó a los EC en 3 clusters principales. El cluster I (n=100) agrupó ensayos cuya terapia principal fue la sistémica, basada en los regímenes FOLFOX y FOLFIRI en pacientes con CCR metastásico. El cluster II (n=100) reunió estudios preclínicos focalizados en terapias dirigidas anti-VEGF, con Bevacizumab como principal agente. El cluster III (n=152) agrupó ensayos anti-EGFR y fue el grupo con el mayor número de estudios que emplearon una única droga (monoterapia) y pacientes estratificados. La clasificación obtenida recapitula la evolución de las terapias en el CCR, y predice un horizonte en el que la correcta estratificación de pacientes y la elección del agente terapéutico adecuado, conducirá al avance en el tratamiento personalizado de la enfermedad.

188 (115) EL SISTEMA INMUNE COMO POSIBLE NUEVO BLANCO CELULAR DE LA AMINOFLAVONA EN UN MODELO DE CÁNCER DE MAMA MURINO

Maríana Callero; Cristina Rodríguez; Aldana Slimo; Elisa Bal De Kier Joff; Andrea Loaiza Perez
Instituto de Oncologia Angel H Roffo

La Aminoflavona (AFP464, NSC 710464), un agente con acción antitumoral en tumores de mama positivos para el receptor de estrógenos (ER+), presenta un mecanismo de acción único activando la vía de señalización del receptor de hidrocarburos arílicos (AhR). Considerando que AhR ha surgido recientemente como un regulador fisiológico de las respuestas inmune innata y adaptativa, nos proponemos investigar si AFP464 modula la respuesta inmune en el modelo murino M05, un adenocarcinoma de mama semi-diferenciado dependiente de estrógeno. Hembras BALB/c fueron inoculadas con el tumor M05. Luego de que el tumor alcanzara un tamaño medio de 30 mm^2, los ratones recibieron AFP464 (12 mg/kg, i.p) por 5 días. A diferentes tiempos de finalizado el tratamiento (13, 21 y 41ds) se identificaron y cuantificaron por citometría de flujo las diferentes poblaciones esplénicas (LTc, LTh, MQ, NK y MDSC), así como las células inflamatorias infiltrantes del tumor. A nivel esplénico pudo observarse que la AFP464 aumentó el número de LTc y de NK, pero disminuyó el número de MDSC respecto del grupo control no tratado. A nivel tumoral, la AFP464 indujo aumentos significativos en el número de LTc, LTh, MQ y NK mientras que redujo el número de MDSC respecto de los controles. Se observó que los esplenocitos aislados de ratones tratados con AFP464 mostraron mayor citotoxicidad específica que el grupo control, en todos los tiempos (1,501 ± 0,072 vs 0,742 ± 0,068; 2,395 ± 0,298vs 1,155 ± 0,239; 2,97 ± 0,192. vs 1,07 ± 0,185 p ≤ 0,05). Finalmente, se determinó, mediante la cuantificación de arginasa, MMP y nitritos, que AFP464 favorece el desarrollo del fenotipo M1 en los macrófagos peritoneales luego de 13 días de tratamiento, efecto que revierte progresivamente, observándose un fenotipo M2 a los 41 días. Estos datos sugerirían que la AFP464 posee además de efectos citotóxicos un efecto inmunomodulador que inhibiría la progresión tumoral.

189 (117) MODULACIÓN MUSCARÍNICA DEL EFECTO CITOTÓXICO DEL PACLITAXEL EN CÉLULAS MDA-MB231

Alejandro J Español[1]; María Di Bari[2];Agustina R Salem[1]; Ilaria Cristofaro[2]; Ada M Tata[2]; María E Sales[1]
CEFYBO[1] Universidad La Sapienza, Roma, Italia[2]

La modulación colinérgica de la progresión tumoral ha sido descripta en diversos tipos de tumores. En nuestro laboratorio demostramos que el tratamiento de tumores mamarios murinos con el agonista colinérgico sintético carbacol promueve la muerte celular. En este trabajo estudiamos el efecto de la combinación de agonistas muscarínicos con el citostático paclitaxel (PX) de uso frecuente en el tratamiento del cáncer de mama, en bajas concentraciones, sobre la viabilidad de células MDA-MB231 derivadas de un tumor mamario humano triple negativo. Utilizando el reactivo MTT observamos que la combinación de carbacol (Carb) (10^{-12}M) con PX (10^{-8}M) produjo una citotoxicidad del 27±3% (p<0,01 vs. control) efecto que no se observó al utilizar cada droga por separado. Además demostramos que una combinación del agonista M_2 selectivo arecaidina (Are) (12,5 uM) que se sabe favorece la muerte celular en glioblastomas, con PX (10^{-9}M) produjo una reducción semejante al Carb en la viabilidad celular (23,46±7,1%; p<0,05) efecto que no se observó con las drogas agregadas por separado. Por Western blot (Wb) confirmamos la expresión de los subtipos M_5>M_1=M_2 de receptores muscarínicos. El silenciamiento con siARN del receptor M_2 revirtió el efecto observado a los valores del control, confirmando la participación de este subtipo de receptor en el efecto citotóxico. Esta combinación también redujo en un 98±6% los niveles de ARNm del transportador de fármacos ABCG2 y en un 97±11% los del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) así como su expresión proteica determinada por Wb (p<0,001 vs. control). La combinación de Carb o Are con PX no modificó la viabilidad de las células maMarías no tumorigénicas MCF-10A que no expresan receptores muscarínicos. Estos resultados sugieren que el tratamiento de Carb o Are combinados con PX podría representar una nueva herramienta terapéutica para el tratamiento del cáncer de mama.

190 (121) EFECTO DE COMPUESTOS AMARGOS SOBRE LA ANGIOGÉNESIS Y LA CAPACIDAD INVASIVA DEL TUMOR SCA-9

Ganna Dmytrenko; María Ester Castro; María Elena Sales
CEFYBO

Previamente demostramos que las células SCA-9, derivadas de un tumor de glándula submaxilar murina, expresan T2R para compuestos amargos (CA). La estimulación de estas células con denatonio (D) (10^{-8}M) o naringenina (N) (10^{-7}M) incrementó la proliferación celular y el crecimiento tridimensional del tumor, efecto que fue revertido por la inhibición de la enzima arginasa con NOHA (10^{-4}M). La invasión local del tumor implica la degradación de la matriz extracelular (MEC) y la formación de vasos sanguíneos, por eso estudiamos la participación de la metaloproteasa-9 (MMP-9) y del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF-A) en la invasión y la angiogénesis inducida por el tumor SCA-9 tratado con CA. Para esto utilizamos esferoides SCA-9 incluidos en una matriz de colágeno y evaluamos el área cubierta por las células periféricas que migran. Observamos que el D induce un aumento del 35,1±9,8% (p<0,001 vs. control) efecto potenciado por el pretratamiento con NOHA (p<0,01 vs. D). La estimulación con N aumentó un 58,8±10,4% el área con respecto al control (p<0,001). Este efecto se inhibió totalmente con NOHA y con aminoguanidina, inhibidor de la óxido nítrico sintasa (NOS) 2 (p<0,001 vs. N). Ambos CA estimularon la expresión medida por Western blot (Wb) (O.D.r)(D: 2,28±0,38; N: 2.00±0,23; p<0,001 vs. control: 1±0,01) y la actividad por zimografía de MMP-9 (D: 1,51±0,07; N: 1,7± 0,2; p<0,05 vs. control: 1±0,06). Además, el agregado de D o N produjo un aumento de VEGF-A medido por Wb (1,79± 0,25 y 3,01±0,02 respectivamente vs. control 1,00±0,17; p<0,001). El NOHA redujo este efecto (p<0,001 vs. CA), mientras que la inhibición de la NOS con L-NMMA potenció el efecto de ambos CA sobre la expresión de VEGF-A (D: 2,87±0.36; N: 3,61±0,10, p<0,05 vs. CA). CONCLUSIÓN: Los CA modulan positivamente la invasión y la angiogénesis en el tumor SCA-9 con la participación de la vía NOS/arginasa.

191 (157) UTILIDAD CLINICA DE LA SECUENCIACION DE NUE- VA GENERACION (NGS) PARA LA IDENTIFICACION DE DE BIOMARCADORES EN PACIENTES CON CANCER DE COLON

Guillermo Federico Bramuglia[12]; Celeste Mosqueira[2]; Belén Zaffanella[2]; Victoria Cólica[13]; Silvia Otero[3]; Carolina Sanchez[3]; Patricia Saldías[3]; Gustavo Jankilevich[3]
Facultad de Farmacia y BioQuímica, UBA[1] Fundación Investigar[2] Hospital Durand-Servicio de Oncología[3]

Introducción El análisis de mutaciones adquiridas en cáncer colorectal (CCR) avanzado es una práctica habitual para la indicación de terapias “blanco” dirigidas. La tecnología de Next Generation Sequencing (NGS) permite la secuenciación masiva de cientos de genes considerados potenciales blancos terapéuticos. Estos análisis proveen información relacionada al desarrollo y progresión tumoral y permiten seleccionar pacientes para el ensayo de nuevas drogas. Objetivo Analizar mediante NGS un panel de 50 genes en pacientes con CCR que tenían indicado la determinación de variantes de KRAS y NRAS mediante PCR-secuenciación. Materiales y métodos Se analizaron muestras de 15 pacientes con CCR que dieron su consentimiento informado. Se extrajo ADN de cortes de biopsias del tumor primario y se analizaron las variantes genéticas de KRAS (exones 2 y 3), y NRAS (exones 2, 3 y 4) mediante PCR-secuenciación. Para el análisis de las variantes mediante NGS se utilizó el Ion Torrent Ion AmpliSeq™ Colon and Lung Cancer Research Panel v.2 Resultados Seis pacientes mostraron mutaciones en el gen KRAS. No se encontraron mutaciones de relevancia clinica en el gen NRAS. El análisis mediante NGS mostró que el porcentaje de ADN clonal y policlonal fue de 71 y 29% respectivamente. El tamaño promedio de los fragmentos analizados fue de 114 pb. El análisis permitió caracterizar variantes mutadas o wildtype en otros genes como

BRAF, PIK3C, y EGFR. Discusión La presencia de mutaciones en el gen KRAS/NRAS en pacientes con CCR metastásico se asocia a resistencia a las terapias con anticuerpos anti-HER1. Sin embargo otras alteraciones en las vías de señalización pueden ser responsables de la aparición de resistencia a los anti-HER1 en pacientes KRAS/NRAS wild-type. La caracterización simultánea de mutaciones en múltiples genes como BRAF, o PI3K permitiría estudiar la respuesta clínica a otros inhibidores en ensayos clínicos de fase temprana.

192 (161) ERBB-2: UNA NUEVA DIANA TERAPÉUTICA Y PRONÓSTICA PARA EL CÁNCER RENAL

María A. Cortes[12]; Rosalía Cordo Russo[3]; Leandro Venturutti[3]; Tania Romina Stoyanoff[4]; Rosana Gerometta[1]; Patricia Virginia Elizalde[3]
Univ. Nac.del Nordeste- Fac. De Medicina- CONICET[1] Univ. de La Cuenca Del Plata- Fac. De Ingeniería Y Tecnología[2] Instituto De Biologia Y Medicina Experimental (IBYME)-CONICET[3] UNIV.Nac. del Nordeste- Fac. de Medicina- Cátedra Bioquímica[4]

La presencia del oncogen HER2/erbB-2 en tumores está asociada con la resistencia a la terapia, la formación de metástasis y, en cáncer de mama, se observó su relación con el factor inducible por hipoxia (HIFα). La implicación de ErbB-2 en el cáncer renal aún no es clara y no hay resultados concluyentes. El carcinoma de células renales (CCR) tiene el gen Von Hipel Lindau (VHL) mutado y HIFα activo en la mayoría de los casos, es refractario a la quimioterapia y cerca del 40% presenta metástasis. Por ello nos planteamos estudiar la presencia de ErbB-2 en pacientes con CCR, su relación con HIF1α y con el estadio tumoral, con el fin de dar luz a nuevas dianas terapéuticas y pronósticas. Se estudió la expresión de ErbB-2 por Inmunohistoquímica (IHQ) y western blot (WB) y HIF1α (IHQ) en 30 muestras de pacientes con CCR, provenientes del Servicio de Anatomopatología del Hospital Escuela y Hospital Vidal de Corrientes. Observamos que 19 de las 30 muestras expresan ErbB-2 (63%). La expresión de HIF1α se observó en un 90% de los pacientes (27/30) y parecería no estar correlacionada con la expresión de ErbB-2. Hipotetizamos que, ErbB-2 podría estar relacionado con HIF2α en este tumor. Existe una tendencia positiva entre ErbB-2 y el estadio tumoral, en pacientes con CCR de células claras de estadio T1 (6 de 11); de estadio T2 (5 de 6) y de estadio T3 (6 de 7). Asimismo, hemos observado, que en los casos ErbB-2 positivos hay relación entre su localización subcelular y el estadio tumoral. Observamos que: en pacientes con estadio T1 y oncocitoma, es más frecuente la localización de ErbB-2 en el citoplasma, con estadio T2, ErbB-2 se localiza en el citoplasma y en el núcleo/membrana, sin embargo en pacientes con estadio T3 es más frecuente encontrar ErbB-2 en el núcleo/membrana. Los hallazgos del presente trabajo indican que ErbB-2 estaría implicado en el avance del cáncer renal y podría ser una diana terapéutica y pronóstica.

193 (162) MODULACIÓN DE LA NEOVASCULARIZACIÓN EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL DE RATONES TNFR1 KNOCK OUT

Yamila Rodríguez[12]; Ludmila Campos[12]; Melina Castro[12]; Ada Blidner[4]; Diego Croci Russo[4]; Gabriel Rabinovich[4]; Verónica Filippa[3]; Sergio Alvarez[12]
IMIBIO SL[1] Laboratorio de Biología Molecular. UNSL[2] Laboratorio de Histología. UNSL-CONICET[3] IBYME[4]

El melanoma es un cáncer de piel asociado a una elevada mortalidad debido a su capacidad metastásica y resistencia a diversas quimioterapias. En tal sentido, el factor de necrosis tumoral (TNF) alfa es una citoquina clave en el desarrollo tumoral con efectos opuestos dependiendo del contexto y tipo celular donde actúe. Previamente, en un modelo de melanoma murino (B16F1) en ratones C57BL/6 wild type (WT) y C57BL/6 TNFR1 knock out (TNFR1-/-), demostramos que la ausencia funcional de este receptor se asocia a una disminución del volumen tumoral ($p<0,05$). Nuevos datos de inmunohistoquímica indican que la tasa de proliferación es significativamente mayor en tumores provenientes de ratones WT. Considerando estos hallazgos, planteamos la hipótesis de que el microambiente tumoral (MT) de ratones TNFR1-/- es menos permisivo para la progresión del melanoma que el MT de ratones WT. Para corroborar esto, utilizamos técnicas de qPCR, ELISA e Inmunofluorescencia. Los resultados muestran que el MT de ratones TNFR1-/- expresa mayores niveles de mRNA de MCP-1, lo cual sugeriría un mayor infiltrado de macrófagos. Por otro lado, si bien los niveles de VEGF a partir de medio condicionado tumoral no fueron significativamente diferentes, observamos un marcado incremento en la microvasculatura tumoral en ratones WT vs. TNFR1-/- ($p<0,05$). Estos resultados sugieren que la ausencia de TNFR1 en el microambiente tumoral afecta la capacidad pro-angiogénica de los tumores implantados lo cual actúa en detrimento del ingreso de factores nutricionales e intercambio de gases dentro del tejido maligno, desfavoreciendo así el crecimiento tumoral. Consecuentemente, la presencia de TNFR1 en el MT cumpliría un rol importante en la progresión del melanoma indicando que estrategias para modular ese microambiente constituyen una alternativa terapéutica racional para el manejo clínico de esta enfermedad.

194 (171) TERAPIA FOTODINÁMICA INDUCIDA POR ÁCIDO5-AMINOLEVULINICO EN CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMARIO MURINO. EFECTO DEL SULFURO DE HIDRÓGENO

Gustavo Calvo; Gabriela Di Venosa; Pablo Vallecorsa; Leandro Mamone; Alcira Battlle;Adriana Casas; Daniel Saenz
Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP), U.B.A.-CONICET

La terapia fotodinámica (TFD) es un tratamiento para inducir daño en un tejido después de la administración de un fármaco fotosensibilizante activado (FS). Luego de su irradiación con luz visible en presencia de oxígeno se generan especies citotóxicas. El ácido 5-aminolevulínico (ALA) es el precursor del FS protoporfirina IX, y la ALA-TFD es una de las técnicas de TFD más ampliamente empleadas. El sulfuro de hidrógeno (H_2S) ha sido reconocido como un gas biológicamente activo, contribuyendo a muchos procesos fisiológicos y patológicos. Junto con el óxido nítrico (NO) y el monóxido de carbono son denominados transmisores gaseosos. Estos transmisores gaseosos atraviesan libremente las membranas, se generan de forma endógena enzimáticamente y tienen funciones definidas a concentraciones fisiológicas. El objetivo de este trabajo fue estudiar el impacto de H_2S en la respuesta del ALA-TFD. Empleamos dos líneas celulares de adenocarcinoma mamario murino, LM3 y LM2. La línea LM3 produce NO mientras que la LM2 no produce NO. Ambas líneas producen H_2S endógenamente. La incubación de las células con NaHS, dador de H_2S, no es tóxico en el intervalo de concentración empleado (0,05-10 mM). Las condiciones de la ALA-TFD fueron: 3 h exposición a ALA 1 mM e iluminación con diferentes dosis de luz. La exposición de las células LM2 a concentraciones crecientes de NaHS superiores a 0,5 mM, inhibió gradualmente la muerte celular inducida por la ALA-TFD y suprimió completamente el efecto de la TFD a partir de 1 mM de NaHS. En las células LM3, la exposición previa a NaHS no modificó el resultado de la TFD. Utilizando una sonda específica, se demostró que el NaHS inhibe la producción de oxígeno singulete *in vitro* producidos después de la iluminación de un FS, sugiriendo que el H_2S podría modular la respuesta celular a la ALA-TFD mediante la inhibición de la producción de especies reactivas del oxígeno.

195 (178) CARACTERIZACIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE MAMA HER2 POSITIVO RESISTENTE AL TRASTUZUMAB

Moira Pissinis;Candelaria O Farrell; María Florencia Mercogliano; Leandro Venturutti; Patricia V Elizalde; Mara De Martino; Roxana Schillaci
IBYME

El trastuzumab (T) es un anticuerpo monoclonal anti-HER2 utilizado en el tratamiento del cáncer de mama HER2 positivo.

Sin embargo, sólo 40-50% de los pacientes que reciben este tratamiento responden. Este fracaso se atribuye a diversos mecanismos de resistencia que se activan en las células tumorales. Aquí caracterizamos una línea celular de cáncer de mama HER2 positiva con resistencia adquirida *in vivo* al T. Usamos las líneas celulares BT-474.m1 (m1) (sensible al T) y BT-474.m1 HR (HR) (resistentes, aisladas en nuestro laboratorio a partir de un tumor no respondedor *in vivo*). Evaluamos la respuesta al T mediante proliferación por incorporación de timidina-H^3. La proliferación de m1 disminuyó con concentraciones crecientes de T pero no se modificó significativamente en las HR, aún a una concentración de 200 µg/ml. También evaluamos otras terapias anti-HER2. El tratamiento con T+pertuzumab (10 µg/ml de cada anticuerpo) inhibió la proliferación de m1 ($p<0.001$) pero no se modificó en las HR. El lapatinib disminuyó la proliferación de ambas líneas celulares de manera similar, a concentraciones entre 0,5 y 5 µg/ml ($p<0.001$). Además evaluamos la citotoxicidad celular mediada por T mediante un ensayo de liberación de Cr^{51} y observamos que las m1 presentaron una citotoxicidad del 47% mientras que las HR del 18% ($p<0,001$). Por otro lado, comparamos las vías de señalización activadas en las m1 y las HR tratadas con IgG vs T mediante Western Blot. Observamos un aumento de fosfo Src en las HR tratadas con T, con respecto a las m1. En base a estos resultados, podemos concluir que tenemos un modelo de resistencia adquirida *in vivo* al T cuyas características se asemejan a los tumores descritos en pacientes. Por lo tanto, seguiremos caracterizando esta línea celular en busca de posibles blancos terapéuticos.

196 (199) EFECTO RADIOSENSIBILIZADOR DE LA HISTAMINA EN UN MODELO DE MELANOMA HUMANO. ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO

Melisa B Nicoud[1]; Diego J Martinel Lamas[12]; Noelia Massari[2]; Horacio Blanco[3]; Elena Rivera[2]; Vanina A Medina[12]
Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED), Facultad de Ciencias Médicas, Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA), y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires[1] Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires[2] Hospital Municipal de Oncología "María Curie", Buenos Aires, Argentina.[3]

La incidencia global del melanoma continúa en aumento. Se ha reportado la expresión de los receptores a histamina (HA) RH1, RH2, RH3 y RH4 en varias líneas celulares de melanoma, a través de los cuales la HA modula la proliferación. El objetivo fue investigar el efecto combinado de la HA y la radiación ionizante (RI) *gamma* sobre la radiosensibilidad de las células de melanoma humano 1205Lu *in vitro* e *invivo*. Para ello, las células fueron tratadas con HA (10 µM) 24 h antes de la irradiación y se evaluaron los parámetros radiobiológicos, incluyendo la fracción de supervivencia a una dosis (D) de 2 Gy (FS2Gy), obtenidos de las curvas de supervivencia ajustados al modelo lineal cuadrático [$FS=e^{-(\alpha D+ \beta D2)}$]. La apoptosis celular se determinó mediante el ensayo de TUNEL y de Anexina-V, mientras que el daño del ADN se evaluó por detección de los niveles de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina y la histona fosforilada H2AX después de D de 2 Gy. La actividad de enzimas antioxidantes y los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) se midieron por espectrofotometría y por citometría de flujo, respectivamente. Los resultados indican que la HA disminuyó la proliferación, aumentó la senescencia y la diferenciación celular e incrementó la radiosensibilidad de las células 1205Lu (FS2Gy: 0.14±0.03 vs. 0.34±0.02 en células no tratadas, $P<0.05$; α: 1.06±0.01 vs. 0.42±0.07 en células no tratadas, $P<0.05$), produciendo el arresto del ciclo celular en la fase G2/M, aumentando la apoptosis y modulando ROS. Además, el tratamiento *in vivo* con HA (1 mg/kg.día, s.c.) de tumores inducidos en ratones *nude* por inyección de células 1205Lu, potenció el efecto antitumoral de la RI (5 D de 2 Gy) reduciendo el tamaño, la celularidad y el índice mitótico, y aumentando el tiempo de duplicación del tumor (21.6±5.7 vs. 10.9±2.3 días en tumores no tratados, $P<0.05$). Podemos concluir que la HA aumenta la radiosensibilidad de las células de melanoma, sugiriendo que podría optimizar la eficacia de la radioterapia. Agradecimientos: Instituto Nacional del Cáncer, CONICET, UBA.

197 (212) LOS INHIBIDORES DE HISTONAS DEACETILASAS, BUTIRATO DE SODIO Y ÁCIDO VALPROICO, AUMENTAN LA SENSIBILIDAD A LA RADIACIÓN IONIZANTE EN CÉLULAS DE CÁNCER FOLICULAR DE TIROIDES

Marina Perona[1]; Lisa Thomasz[12]; Luciano Rossich[1]; Mario Pisarev[123]; Guillermo Juvenal[12]
Departamento de Radiobiología (CAC), Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA)[1] Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)[2] Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina (UBA), Buenos Aires, Argentina[3]

Introducción: El cáncer de tiroides es una de las formas más comunes de tumores endocrinos. El tratamiento convencional consiste en tiroidectomía total y posterior administración de 131I. El uso de los HDACI podría ser de utilidad para aumentar la respuesta a la radiación externa de cánceres de tiroides recurrentes que no responden a los tratamientos terapéuticos convencionales. Objetivos: Estudiar el efecto y los mecanismos de acción de los HDACI butirato de sodio (NaB) y ácido valproico (AV) en el tratamiento del cáncer pobremente diferenciado de tiroides. Materiales y Métodos: Células de la línea de cáncer humano tiroideo folicular (WRO) fueron incubadas con NaB y AV e irradiadas con una fuente de 137Cs (1 Gy/min). Se midió la sobrevida celular (ensayo clonogénico), la muerte celular, la distribución en el ciclo celular y el daño al ADN mediante la técnica de inmunofluorescencia de la histona H2AX fosforilada a distintos tiempos post irradiación. También se estudió la capacidad de rediferenciar las células a través de la captación de 125I, el análisis de la expresión del transportador de iodo NIS y ensayo de transfección transiente. Resultados: La fracción de sobrevida a 2 Gy disminuyó de 68,8±0,8 del control a 42,7±2,7 ($p<0,001$) y a 56,3±1,6 ($p<0,01$) en células tratadas con NaB y AV, respectivamente. A los tiempos largos post irradiación aumentó la muerte celular en las células tratadas ($p<0,01$), siendo la necrosis predominante. Se observó un arresto en la fase G2/M del ciclo celular en las células tratadas (6 h) que fue disminuyendo en el tiempo. El análisis del daño radioinducido al ADN mostró un mayor número de focos/célula y diámetro de los focos de daño en las células irradiadas con los HDACI ($p<0,05$). No se observó a la dosis y tiempo utilizados un efecto rediferenciador de los compuestos. Conclusiones: El butirato de sodio y el ácido valproico, ambos HDACI, funcionarían como radiosensibilizadores en células de cáncer pobremente diferenciado de tiroides.

198 (215) FOTOSENSIBILIZACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES EMPLEANDO NUEVOS DERIVADOS MESO-SUSTITUIDOS DE PORFIRINAS

Pablo Vallecorsa[1]; Darío Ferreyra[2]; Gabriela Di Venosa[1]; Leandro Mamone[1]; Gustavo Calvo[1]; Daniel Sáenz[1]; Alcira Batlle[1]; Edgardo Durantini[2]; Adriana Casas[1]
CIPYP[1] FCEFQYN[2]

La Terapia Fotodinámica (TFD) involucra la administración de un fotosensibilizante (FS) y la subsiguiente irradiación con luz visible, la cual promueve la generación de especies altamente reactivas del oxígeno, que atacan distintas biomoléculas produciendo la muerte celular. En el presente trabajo, se testearon 4 nuevos derivados de porfirinas *meso*-sustituidas como potenciales FS en la línea tumoral LM3 de adenocarcinoma mamario murino. Se usaron la 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-*N*,*N*-dimetilaminopropoxi)fenil] porfirina (TAPP), la 5,15-di(4-[3-*N*,*N*-dimetilaminopropoxi] fenil)-10,20-di(4-trifluorometilfenil) porfirina (A2B2), la 5,10,15,20-tetrakis[3-(*N*-etil-*N*-metilcarbazoil)] clorina (TEMCC) y su porfirina análoga TEMCP. Los FS mostraron la típica banda de Soret a ~420 nm y las cuatro bandas Q entre 515 y 650 nm. Estos FS producen oxígeno singulete con rendimientos cuánticos de 0,40-0,53. A partir de la toxicidad celular en oscuridad se determinaron las concentraciones máximas de trabajo: 2,5 mM para TAPP y A2B2; y 5 mM para TEMCC y TEMCP (3 h incubación). Para testear su eficacia como FS, las células LM3 se expusieron a los FS a las concentraciones mencionadas, durante 3 h y luego se irradiaron con un banco de tubos fluorescentes (potencia: 0,5 mW/cm^2). Las

dosis lumínicas letales 50, definidas como las dosis de luz que inducen el 50% de muerte celular (DL50) fueron: TAPP: 135 mJ/cm^2, TEMCC: 360 mJ/cm^2, TEMCP: 420 mJ/cm^2, A2B2: 600 mJ/cm^2, demostrando que TAPP es el derivado más fotoactivo. Por ello, se escogió esta porfirina para continuar su caracterización. Estudios de incorporación sugieren que TAPP es principalmente transportado por difusión pasiva. La colocalización de TAPP con sondas fluorescentes específicas para organelas sugieren que TAPP se localiza principalmente en mitocondria. La administración i.p. de TAPP en ratones portadores de tumor LM3 inyectado s.c. indican que existe localización de la porfirina en el tumor.

199 (217) CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA PROVEEN UN NICHO PRE-METASTÁTICO QUE PROMUEVE LA EXPANSIÓN DE CÉLULAS TUMORALES MAMaríaS CON CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE CÉLULASMADRE

María Paula Marks[2]; Leandro Marcelo Martínez[3]; Vivian Lavobsky[3]; Sabrina Fletcher[4]; Choi Hosoon[5]; Calvo Juan Carlos[24]; Norma Alejandra Chasseing[23]; Luciano Vellón[2]
Laboratorio de Células Madre, IBYME[2] Laboratorio de Inmunohematología, IBYME[3] Laboratorio de Química de Proteoglicanos y Matriz Extracelular, IBYME[4] Texas A&M Health Science Center, College of Medicine[5]

La adquisición y pérdida del estado de célula madre tumoral (CMT) podría estar regulado por señales del microambiente tumoral, induciendo o inhibiendo la reprogramación de células tumorales con fenotipos preexistentes más susceptibles de adquirir características de CMT. La médula ósea de pacientes con cáncer de mama (PCMa) en estadíos avanzados está enriquecida en factores solubles y componentes de matriz extracellular que facilitan el establecimiento y crecimiento de células tumorales, constituyendo un nicho pre-metastático. Para determinar si dicho microambiente promueve la expansión de células con características CMT, se evaluó el efecto de medios condicionados (MC) de células estromales mesenquimales de médula ósea de PCMa en estadío IIIB y de donantes sanas sobre la frecuencia de células madre en células MCF-7 infectadas con un vector lentiviral bicistrónico que co-expresa el factor de pluripotencia Sox2 y una proteína fluorescente (MCF-7/Sox2). La frecuencia de células madre se determinó por el ensayo de formación de mamoesferas por dilución límite y el análisis estadístico se realizó con la herramienta online disponible en el Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research Bioinformatics Division. (http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda). Sox2 aumentó la frecuencia de unidades formadoras de mamoesferas en células MCF-7/Sox2 (1/5,4; intervalo de confianza IC=95% 1/2,1-1/13,5), respecto de la línea parental MCF-7 (1/54,3; IC=95% 1/40-1/88,4). Interesantemente, se observó por ELISA un aumento significativo de los niveles de CCL2, quimoquina relacionada con la expansión de CMTs, en los MC de PCMa respecto de las donantes sanas (1302, 2±762,1 pg/ml vs. 182,3±71,8 pg/ml; p<0,05; normalizado por 5x10E5 células). Los MC de PCMa utilizados en cultivo al 20% aumentaron la frecuencia de mamoesferas (p<0,05) en células MCF-7/Sox2, indicando que un nicho pre-metastático promueve la expansión remota de células tumorales de mama con características CMT a priori.

200 (219) ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LA SENESCENCIA CELULAR INDUCIDA POR EL BLOQUEO DE STAT3 EN UNA INMUNOTERAPIA CONTRA EL CÁNCER DE MAMA

Mara De Martino; María Florencia Mercogliano; Leandro Venturutti; Mercedes Tkach; Patricia Virginia Elizalde; Roxana Schillaci
IBYME

Previamente demostramos que la inmunización con células de cáncer de mama (CM) con Stat3 bloqueado induce una respuesta antitumoral dependiente de linfocitos T CD4+ y células natural killer (NK). Asimismo, comprobamos que el bloqueo de Stat3 genera senescencia celular por inactivación de oncogen e induce un secretoma asociado a senescencia (SAS). Aquí investigamos el mecanismo de senescencia inducido por el bloqueo de Stat3 y utilizamos los sobrenadantes (SN) de células con Stat3 bloqueado para promover una respuesta inmune antitumoral. Para ello, utilizamos líneas celulares de CM ErbB2 positivo y triple negativo, de cáncer de colon y melanoma. Observamos que el bloqueo de Stat3 está asociado con un aumento en la expresión de los marcadores de senescencia p16INK4a o p21Cip1, disminución de Rb (por Western blot), incremento de la actividad de ß-galactosidasa ácida y formación de heterocromatina (inmunofluorescencia de trimetilación de lisina 9 de la histona 3). La senescencia se revertió silenciando p16INK4a o p21Cip1, según corresponda. Luego realizamos un ensayo preclínico utilizando el modelo murino de CM ErbB2 positivo C4HD. Inmunizamos 3 veces ratones con pellets preparados a partir del SN de células C4HD transfectadas con ARNi contra Stat3 (senescentes), Stat3 y p16INK4a (no senescentes) o un ARNi Control junto con células C4HD irradiadas, y luego desafiamos con el tumor C4HD. La inmunización con SN de células con ARNi contra Stat3 o Stat3 y p16INK4a disminuyó el crecimiento tumoral un 84% y 74% vs. ARNi Control, respectivamente (P<0.01). En aquellos dos grupos se observó un incremento de citotoxicidad de células NK y de linfocitos T CD4+ de memoria vs. control, (P<0,05 y P<0,05, respectivamente). Estos resultados sugieren que la inhibición de Stat3 induce un programa de senescencia en diversos tipos de tumores. El secretoma de células de CM con Stat3 bloqueado actúa como adyuvante antitumoral efectivo independientemente del SAS.

201 (236) INTERACCIÓN ENTRE KLF4 Y LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN CELULAR DE TGFß EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

María Eugenia Cozzarin; Micaela Stedile; Natalia Rubinstein;Omar A. Coso; Ana R. Raimondi
Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias, IFIBYNE, UBA-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

El cáncer de cabeza y cuello (CCC) es el sexto cáncer más frecuente a nivel mundial y su tasa de sobrevida luego del diagnóstico es menor al 50%. El factor de transcripción Klf4 participa en el control de la proliferación y diferenciación celular, está ausente en neoplasias de la mucosa gastrointestinal en contraposición a cáncer de mama donde actuaría como un oncogén. La vía de señalización celular de TGFbeta mantiene la homeostasia tisular regulando la proliferación y diferenciación celular. KLF4 puede actuar como un activador transcripcional de diversos genes ante el estímulo de TGFβ. Previamente hemos descripto en líneas celulares de CCC la expresión proteica de KLF4. Objetivo: estudiar una posible interacción entre KLF4 y la vía de TGFbeta analizando la respuesta de células de CCC al estímulo con TGFbeta1 y los niveles de expresión de KLF4 ante el mismo tratamiento. Se determinó la proliferación celular por recuento celular luego del tratamiento con TGFβ1 (2ng/ml) por 2, 4, 24 y 48 hs. Las células HN12 disminuyeron su proliferación celular luego del tratamiento con TGFβ1 por 48hs (p<0.05) no así las células HN30. Se comparó el efecto del tratamiento con TGFbeta1 sobre las células HN12 y 30 encontrando que las HN12 presentaban una tasa de proliferación significativamente mayor que las 30 (t-test p<0.05). Determinamos la expresión de KLF4 en 3 líneas celulares de CCC por qRT-PCR y se normalizo a GAPDH. Los niveles de KLF4 comparados con queratinocitos normales (HaCaT) fue menor para dos de las tres líneas celulares analizadas (HN13 y 30). Las células HN12 presentaron valores 4 veces mayores a los de las células HaCaT. El efecto del tratamiento con TGFβ1 sobre los niveles de expresión de KLF4 en las células HN30 y 12 demostró una tendencia al aumento de su expresión en las células HN30 luego de 48hs de tratamiento. Al silenciar Klf4 en las células 12 y 30 ambas líneas disminuyeron la proliferación celular pero solo las HN12 silenciadas recuperaron los niveles de proliferación luego del tratamiento con TGFβ1. Las líneas celulares HN12 y 30 difirieron en los niveles de expresión de KLF4, las células HN12 respondieron al efecto inhibitorio de TGFβ1 y aumentaron la proliferación celular luego del silenciamiento de Klf4. La línea celular HN12 presentó una modulación de la expresión de KLF4 ante el tratamiento con TGFβ1.

203 (265) GALECTINA-1 MODULA LA EXPRESIÓN DE INTEGRI- NA β1 Y CONTRIBUYE A LA RESISTENCIA A LA APOPTOSIS INDUCIDA POR DROGAS EN CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR (CHC)

Pablo Carabias[1]; María Lorena Bacigalupo[1]; Malena Manzi[1]; Silvina Otero[1]; María Teresa Elola[1]; Carlota Wolfenstein De Todel[1]; Gabriel Adrian Rabinovich[2]; María Victoria Espelt[1]; María Fernanda Troncoso[1]
IQUIFIB (UBA-CONICET), Dpto. Química biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA[1] IByME-CONICET[2]

Galectina-1 (Gal1), proteína que une β-galactósidos, está aumentada en el CHC y se relaciona a una mayor agresividad. El factor de crecimiento transformante β1 (TGFβ1) induce la transición epitelio-mesénquima (TEM), clave en el desarrollo de metástasis. Además, promueve la capacidad invasiva de células de CHC induciendo la expresión de integrina β1, un receptor de adhesión celular que protege a las células tumorales de la apoptosis inducida por quimioterapia. Previamente mostramos que TGFβ1 aumenta la expresión de Gal1 en células de CHC y que Gal1 favorece la adhesión mediante integrinas α1, α2, α3, αV y β1. También, que en células de CHC que sobreexpresan Gal-1 (HepG2Gal1) se induce TEM y una mayor expresión de MDR1/glicoproteína P, involucrada en el eflujo de drogas. El objetivo fue determinar si la expresión de Gal1 en células de CHC modula los niveles de integrina β1 y afecta la resistencia a drogas. Mediante Western blot observamos un incremento de integrina β1 en células HepG-2Gal1 (145,5±12,4% 24h; 127,0±9,4% 48h) vs controles (100%). TGFβ1 (5ng/ml 24h) también aumentó los niveles de integrina β1 (142,5±5,9% vs 100% control). Las células HepG2Gal1 presentaron mayor viabilidad (MTT) respecto a los controles al ser incubadas con las drogas quimioterapéuticas camptotecina (CPT, 1μM, 58,5% vs 49,9% 24h; 46,7% vs 39,5% 48h) y doxorrubicina (DOX, 5μM 68,9% vs 57,4% 24h; 36,9% vs 31,8% 48h). La resistencia a la muerte se confirmó mediante tinción con Hoechst y evaluando la morfología nuclear por microscopía. Se obtuvo un menor porcentaje de núcleos apoptóticos en células HepG2Gal1 respecto a los controles al ser incubadas con CPT (1μM, 5,1±1,8% vs 14,7±5,3% 24h; 17,4±7,1% vs 53,2±21,9% 48h) y DOX (5μM, 10,1±1,7% vs 13,9±1,5% 24 h; 28,5±5,6% vs 45,1±5,4% 48h). La sobreexpresión de Gal1 en células HepG2 aumentó el nivel de integrina β1 y redujo la apoptosis inducida por CPT y DOX, lo que sugiere su contribución a la invasión y quimiorresistencia de células de CHC.

205 (279) ACCIÓN ANTITUMORAL IN VITRO E IN VIVO DE UN NUEVO DERIVADO SINTÉTICO DE PENICILINA

Viviana Blank[1]; Yanina Bellizzi[1]; Patricia Cornier[2]; Carina Delpiccolo[2]; Dora Boggian[2]; Ernesto Mata[2]; Leonor Roguin[1]
IQUIFIB. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA.[1] IQUIR. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario[2]

Las triazolil aminoacil penicilinas (TAP) son nuevos compuestos híbridos formados por una porción penicilánica unida a una porción peptídica a través de un grupo triazol. En particular, el derivado que contiene el dipéptido fenilalanina-leucina (TAP6) presenta una acción antiproliferativa 30 veces más potente en una línea de melanoma murino B16F0 (IC_{50} 3±1 μM) que en células no neoplásicas derivadas de epitelio mamario murino. Con el propósito de explorar el mecanismo de acción antitumoral de este derivado en células B16F0, evaluamos su efecto sobre el ciclo celular y su capacidad de inducir apoptosis. Además, investigamos si el compuesto afecta la migración celular y exploramos su acción *in vivo* en un modelo murino de melanoma. Por ensayos de citometría de flujo demostramos que TAP6 induce arresto celular en la fase S luego de 18 h (control 32±5%, TAP6 48±4%, p<0,001). También se observó un aumento del porcentaje de células hipodiploides en función del tiempo de incubación (14±6%, 42±3%, 60±8% y 88±4%, luego de 6h, 18h, 24h y 48h, respectivamente), un incremento del porcentaje de células apoptóticas tempranas (10±3%) y tardías (45±4%) y un aumento en la actividad de caspasa 3 luego de 18h. Además, se detectaron células apoptóticas por tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio. Mediante el ensayo de la herida, demostramos que TAP6 inhibe la migración de células B16F0 (43±6 vs 68±6% control p< 0,001). Con el fin de evaluar su acción *in vivo,* se inocularon ratones C57BL/6 con células B16F0. A partir del día 10, se administraron 5 dosis de 20 mg/kg de TAP6 durante 15 días. Al finalizar el tratamiento, se observó una disminución del 52% (p<0.01) del volumen tumoral. En conclusión, los resultados obtenidos sugieren que TAP6 es un agente selectivo que induce arresto del ciclo celular y apoptosis, e inhibe la migración de células B16F0. Asimismo, la eficacia antitumoral de TAP6 fue demostrada en un modelo murino de melanoma.

206 (316) HEMO OXIGENASA-1 ENDOTELIAL REGULA LA IN- TERACCIÓN DEL COMPARTIMENTO VASCULAR CON CÉLULAS TUMORALES DE PRÓSTATA

Felipe Martin Jaworski; Geraldine Gueron; Daniel Georges Compagno; Diego Jose Laderach; Elba Susana Vazquez
Departamento de Química Biológica, FCEYN, UBA / IQUIBICEN - CONICET

La inflamación es un factor de riesgo en cáncer de próstata (CaP), la afección neoplásica más frecuente y una de las más letales en hombres. Nuestros trabajos previos demostraron que Hemo Oxigenasa-1 (HO-1) emerge como un mecanismo homeostático en la célula tumoral ante procesos inflamatorios. En este trabajo analizamos el rol que HO-1 juega en células del estroma tumoral. El pre-acondicionamiento del estroma por tratamiento s.c. con hemina en animales C57BL/6 produce un aumento significativo en el tiempo de latencia tumoral (P<0,01) y disminución de la tasa inicial de crecimiento tumoral (P<0,05). Para estudiar el rol de HO-1 en el compartimento vascular, se indujo HO-1 farmacológica y genéticamente en células endoteliales de cordón umbilical (HUVECs), por tratamiento con hemina y por infección con adenovirus conteniendo la secuencia codificante de HO-1, respectivamente. Mediante ensayos in vitro de formación de túbulos demostramos que dicho proceso está impedido al inducir HO-1 en HUVECs sólo en presencia de medio condicionado de células de CaP TRAMP-C1 (TC1) (P<0,01). Esto sugiere que HO-1 endotelial es capaz de atenuar la neovascularización en un microambiente tumoral. Una monocapa de HUVECs con sobreexpresión de HO-1 resultó menos permisiva a la unión de células TC1 (P<0,01), demostrando que HO-1 modula la interacción entre ambos tipos celulares. Para determinar si HO-1 endotelial afecta propiedades de la célula tumoral, efectuamos ensayos con medios condicionados (MC) de células HUVECs con expresión diferencial de HO-1. La adhesión de TC1 al endotelio no mostró diferencias significativas por pre-tratamiento con MC (P>0,05). En cambio, la presencia de MC de HUVECs con inducción de HO-1 disminuyó la migración (ensayo de cierre de herida; P<0,001) e invasión (usando cámaras de Matrigel; P<0,05) de células tumorales. En su conjunto, estos resultados sugieren que HO-1 endotelial juega un papel preponderante en la interacción con el compartimento tumoral.

207 (318) RELEVANCIA DE LA INHIBICIÓN DE QUINASAS DEPENDIENTES DE CICLINAS EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MADRE DERIVADAS DE GLIOMAS DE ALTO GRADO

Guillermo Agustín Videla Richardson; Carolina Paola Garcia; Olivia Morris Hanon; Verónica Alejandra Furmento; Damián Darío Fernandez Espinosa; Horacio Martinetto; María Élida Scassa; Gustavo Emilio Sevlever
Laboratorio de Investigación Aplicada a Neurociencias (LIAN). FLENI

Los gliomas de alto grado exhiben una organización jerárquica y se ha postulado que su generación ocurre a partir de células madre tumorales (CMT), las cuales corresponderían a una subpoblación minoritaria capaz de generar y propagar tumores al ser inyectadas en ratones inmunodeficientes. Las CMT se definen por su tumorigenicidad, su capacidad de autorrenovación y su potencial de diferenciación. La obtención de CMT derivadas de pacientes resulta de gran utilidad para comprender la biología de los gliomas y ofrece la posibilidad de realizar investigaciones

traslacionales que contribuyan al desarrollo de terapias personalizadas. Los gliomas exhiben alteraciones genéticas que incluyen la amplificación de los genes que codifican a las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) CDK4 y CDK6. En los últimos años se han reportado resultados muy alentadores en ensayos clínicos de distintos tipos de cáncer basados en el uso de Palbociclib, un inhibidor específico de CDK4/6. El objetivo de este trabajo consiste en evaluar el rol de distintas CDKs en líneas de CMT, las cuales han sido establecidas y caracterizadas en nuestro laboratorio. Para este fin, se inhibió farmacológicamente a CDK4 y CDK6 mediante el uso de Palbociclib y a CDK2 mediante el uso de Roscovitina. Mediante ensayos de incorporación de BrdU, determinamos que la inhibición de CDK4/6 produjo una considerable inhibición de la proliferación celular, mientras que la de CDK2 sólo redujo parcialmente la capacidad proliferativa de estas células. Además, luego del tratamiento prolongado con Palbociclib se observó la aparición de un fenotipo senescente dada la elevada actividad β-galactosidasa. Notablemente, en ciertas líneas celulares la inhibición sostenida de CDKs conllevó cambios fenotípicos compatibles con la diferenciación celular. Estos resultados sugieren que la inhibición de CDK4/6 en gliomas de alto grado podría ser un posible blanco terapéutico destinado a reducir la proliferación de estos tumores cerebrales.

208 (319) LA ASOCIACIÓN ENTRE HEMO OXIGENASA 1 Y PROTEÍNAS REGULADORAS DEL CITOESQUELETO INDUCE UN CAMBIO MORFOLÓGICO EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA

Alejandra Paez[1]; Carla Pallavicini[2]; Giudice Jimena[3]; Emiliano Ortiz[1]; Federico Schuster[1]; Nicolas Anselmino[1]; Luciana Bruno[2]; Valeria Levi[2]; Elba Vazquez[1]; Geraldine Gueron[1]
Departamento de química biológica, FCEyN-UBA/ IQUIBICEN-CONICET[1] Departamento de física, FCEyN-UBA/ CONICET[2] Department of Pathology and Immunology, Baylor College of Medicine, USA[3]

La motilidad celular involucra variaciones en el citoesqueleto. Los rearreglos de actina en la periferia de una célula permiten su motilidad y la pérdida del contacto célula-célula aumenta su capacidad migratoria. Hemo oxigenasa 1 (HO-1), involucrada en la degradación del hemo, tiene un rol crítico en cáncer de próstata (PCa) disminuyendo la migración e invasión y aumentando la adhesión. En este trabajo se analizó la dinámica del citoesqueleto en la periferia celular. Para cuantificar los contactos celulares, dos líneas celulares de PCa fueron tratadas con hemina y teñidas con faloidina-rodamina. Se analizaron regiones en las cuales se observaba contacto de filopodios entre células vecinas a distancias celulares constantes. Se determinó un perfil de intensidades en estas regiones, con un algoritmo diseñado para contar contactos. Los microtúbulos se analizaron en células PC3 por microscopía confocal y microscopía de reconstrucción óptica estocástica (STORM). Aunque no varió la longitud de persistencia de los microtúbulos de células que sobre-expresan HO-1, se observaron variaciones significativas en el número de filopodios y contactos celulares. Para identificar proteínas asociadas a HO-1 e involucradas en la regulación del citoesqueleto, se inmunoprecipitaron lisados de células PC3 que expresaban FLAGHO-1. El producto se sometió a LC/ESI-MSMS y el análisis por ontología génica mostró un enriquecimiento de proteínas asociadas a la organización del citoesqueleto. Entre las proteínas identificadas se encontraron, Gelsolina y Tropomodulina, involucradas en la regulación de las fibras de estrés. El análisis de genes modulados por HO-1 (RT-qPCR Oligo GEArray) reveló que HO-1 regula genes como Actina alfa-3 y MMP14, relacionados con la motilidad celular. Estos resultados muestran que HO-1 induce la remodelación de los filamentos de actina, alterando la morfología celular en PCa.

209 (321) ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA BAALC EN LEUCEMIAS AGUDAS

María Mercedes Abbate; Daiana Beatriz Leonardi; Geraldine Gueron; Elba Vazquez; Javier Cotignola
Departamento de Química Biológica, FCEYN, UBA/IQUIBICEN, CONICET

Las leucemias agudas (LA) se caracterizan por una alta frecuencia de alteraciones cromosómicas. Sin embargo, un gran número de pacientes presenta un cariotipo normal o rearreglos poco frecuentes, y la biología de estos tumores en su mayoría es desconocida. Dentro de este subgrupo, 28% de los pacientes con Leucemia Mieloide Aguda (LMA) y 65% con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) sobre-expresan el gen BAALC (brain and acute leukemia, cytoplasmatic). En LMA la sobre expresión de este gen es considerada un marcador de mal pronóstico ya que se asocia con una menor sobrevida global. Sin embargo, la función de BAALC en el desarrollo hematopoyético y su participación en las leucemias todavía no está dilucidada. El objetivo de este trabajo es estudiar la expresión de BAALC en muestras de pacientes con LA prevenientes de bases de datos públicas de microarryas de expresión (GSE48558, GSE9476 y GSE12417) utilizando el programa estadístico GEO2R del NCBI basado en Bioconductor; y estudiar la función de BAALC en las líneas celulares: HL-60 (LMA promielocítica), Jurkat (LLA-T), KG-1 (LMA promieloblástica) y U-937 (derivadas de linfoma). Observamos un aumento en los niveles de BAALC de 4,45 veces en pacientes con LLA con respecto a células hematopoyéticas normales ($p=3,14x10-6$), y de 1,27 veces en LMA (p=ns). Además, en LMA se vio que los pacientes con una sobrevida global menor a 1 año tienen un aumento de 1,22 veces de la expresión de BAALC ($p<0.05$). Con el objetivo de caracterizar las líneas celulares, se analizó la expresión de las distintas variantes de splicing del gen por RT-qPCR y se confirmó su identidad mediante secuenciación directa. La variante que incluye los exones 1-8 se expresa en la línea KG-1a y la variante 1-2-6-8 en HL-60 y U-937. También se analizó la expresión de las variantes 1-6-8 y 1-5-6-8. En resumen, utilizando datos de microarrays de expresión corroboramos que la expresión de BAALC es un marcador de mal pronóstico en LA.

210 (323) CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA HUMANO BASALES EXPRESAN Y SECRETAN RSPO3

Carla M Felcher[1]; Johanna M Tocci[1]; Martin Abba[3]; A Gabriela Acosta[2]; M Victoria Goddio[1]; Olga A Castro[2]; Edith C Kordon[1]
IFIBYNE - UBA - CONICET[1] IQUIBICEN - UBA - CONICET[2] UNLP - CONICET[3]

R-spondin 3 (Rspo3) es parte de una familia de proteínas secretorias involucradas en desarrollo embrionario, diferenciación celular y enfermedades humanas. Previamente, hallamos que Rspo3 está frecuentemente sobre-expresado en tumores mamarios murinos inducidos por el virus MMTV y detectamos su presencia en líneas celulares tumorales de ratón que no expresan receptores de estrógenos ni progesterona (ER-PR-). Su silenciamiento en las mismas redujo su capacidad migratoria y tumorigénica in vivo, y su agregado al medio de cultivo de células no tumorales indujo la transición epitelio-mesenquimal de éstas. Por lo tanto, postulamos que Rspo3 es un potente oncogén en células maMarías murinas. El objetivo de este trabajo fue analizar la expresión y secreción de Rspo3 en líneas tumorales maMarías humanas. Por análisis de Western Blot (WB), detectamos que las líneas basales (ER-PR-) MDA-MB 231 y Hs578T expresan mayores niveles de Rspo3 en comparación con las células ER+PR+, MCF7 y T47D. Resultados similares fueron obtenidos por análisis de bases de datos a nivel de mRNA. Por otro lado, mediante las técnicas de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica en MDA-MB 231, detectamos la presencia de Rspo3 en el citoplasma y en el medio extracelular. Dado que Rspo3 posee regiones de alta afinidad por glicosoaminoglicanos de la membrana y/o matriz extracelular, analizamos la presencia de esta proteína en medios condicionados de células MDA-MB 231 en cultivo, tratadas o no con heparina para verificar tal asociación. Los datos obtenidos por WB confirman el enriquecimiento del medio de cultivo luego del mencionado tratamiento. Además, determinamos por estudios bio-informáticos y tratamiento con la enzima PNGasa, que el Rspo3 secretado estaría glicosilado. Estos resultados indican que las células maMarías humanas expresan niveles detectables de Rspo3 glicosilado, el cual permanecería asociado al microambiente tumoral ejerciendo, posiblemente, un efecto autocrino sobre las mismas.

211 (326) RELEVANCIA CLÍNICA DEL INTERACTOMA DE HEMO-OXIGENASA 1 (HMOX1) EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA

Emiliano Germán Ortiz; Alejandra Páez; Federico Schuster; Nicolás Anselmino; Sofía Lage Vickers; Javier Cotignola; Elba Vazquez; Geraldine Gueron
Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA/IQUIBICEN-CONICET

El desafío actual en la lucha contra el cáncer de próstata (PCa) es la incapacidad de distinguir la enfermedad agresiva de la indolente. Considerando la heterogeneidad del PCa, un único biomarcador no es suficiente para predecir el destino de la enfermedad. Las plataformas proteómicas de alto rendimiento se usan con el objetivo de identificar y cuantificar biomarcadores específicos y sensibles para la detección, y estratificación del PCa. Para identificar las proteínas que interactúan con HO-1, se construyeron proteínas recombinantes HO-1FLAG y FLAGHO-1. Con estas construcciones, transfectamos la línea celular PC3 y se utilizaron beads magnéticas anti-FLAG para capturar las proteínas de fusión mediante inmunoprecipitación. Luego se procedió al estudio por MALDI-TOF/TOF y posterior análisis bioinformático de los genes asociadas a HO-1, utilizando las bases de datos Oncomine y cBIoPortal. Estas herramientas nos permitieron a través de análisis pre computarizados, identificar si estos genes tienen una alta significancia estadística para sobre expresión o sub expresión comparando la próstata normal vs. adenocarcinoma de próstata y también a través de los diferentes grados de Gleason. A cada gen se le asignó un “gene Rank” (un valor para su expresión dentro de dicho array) y se estableció un “median rank”, que es la mediana de dicho ranking génico para el gen de interés comparando los distintos microarrays. Además, se analizó la expresión proteica de dichos genes, en tejido a través de la plataforma Human Protein Atlas. El análisis reveló que entre los genes interactores de HO-1, MMP9 y ZNF589 están sobre expresados en adenocarcinoma de próstata vs. Próstata normal y que ANXA2 y AHSG están sub-expresados. Tanto los genes sobre o sub expresados están en el 10% o menos, de los genes más alterados en los tumores próstaticos, reflejando su relevancia como potenciales blancos terapéuticos en la carcinogénesis de próstata.

517 (3) TERAPIA GÉNICA EN MELANOMA: 2D, 3D E IN VIVO

Chiara Fondello; Gerardo C. Glikin; Liliana M. E. Finocchiaro
Instituto de Oncología Angel H Roffo

El melanoma maligno es un tumor altamente agresivo y heterogéneo, debido principalmente a su plasticidad fenotípica. Buscando reflejar la heterogeneidad observada en pacientes de melanoma, trabajamos con líneas celulares humanas (Mh1, Mh2 y Mh4) y caninas (Ak, Ov, Bk, Rk, Br y Ll) establecidas en el laboratorio, a partir de cultivos primarios de tumores de pacientes del Instituto “Ángel H. Roffo” y pacientes veterinarios caninos. En todas las líneas, evaluamos los efectos de la terapia génica mediante la lipofección del sistema de gen suicida de la timidina quinasa del virus herpes simplex (HSVtk/GCV) (GS) o del gen Interferón beta (IFN-ß), y de su combinación con bleomicina (BLM) en Mh1, Mh2, Ak y Ov. Obtuvimos una citotoxicidad diferencial entre las líneas: sensibles al IFN-ß (Mh2, Mh4, Ll), al GS (Mh1, Ov, Bk), y a ambos tratamientos génicos (Ak, Rk, Br). La BLM potenció el efecto citotóxico de la lipofección con el gen del IFN-ß, en monocapas de todas las líneas evaluadas, y en esferoides de Mh1. Esto no ocurrió con el GS. En todas las líneas caninas, encontramos una alta correlación (R2: 0,84, p: 0,0073) en la respuesta al GS de los tumores in vivo y los correspondientes esferoides. El ajuste fue menor cuando las mismas células fueron cultivadas como monocapas subconfluentes (R2: 0,49). También encontramos una correlación significativa (p) entre el índice de proliferación (IP) (células en s+G2/M+hiperdiploide), y la respuesta a los tratamientos genéticos y siendo ésta mayor en esferoides (p: 0,0046) que en monocapas (p: 0,0257). Esto no ocurrió cuando los tratamientos genéticos se combinaron con BLM. Conclusiones: La citotoxicidad diferencial en las líneas evaluadas, refleja su heterogeneidad. El esferoide correlaciona significativamente con los resultados in vivo, siendo un mejor modelo para predecir la respuesta clínica de los tumores. La sensibilidad a los tratamientos génicos se correlaciona con el porcentaje de células proliferantes.

NEUROCIENCIAS 3

212 (38) VARIACIONES DE LA RELACIÓN ENTRE LA SUPERFICIE DEL LÓBULO PREFRONTAL Y LA SUPERFICIE DEL CUERPO CALLOSO EN IMÁGENES PARASAGITALES DE RESONANCIA MAGNÉTICA DE AMBOS SEXOS CON EL AVANCE DE LA EDAD

Alicia Beatriz Merlo; Alfonso Albanese; Jorge Miño;Elena Gómez; Eduardo Albanese
Univ. del Salvador Fac. de Medicina

En reuniones de SAIC mostramos en imágenes parasagitales de resonancia magnètica (IPRM) que con el avance de la edad se reduce la superficie del lóbulo prefrontal (SLPF); la superficie del cuerpo calloso (SCC) también se reduce (Merlo et al Rev Chil Anat 2002, 20:131-138). OBJETIVO Cuantificarr en ambos sexos en IPRM la variación de la relación SLPF/SCC con el avance de la edad. MATERIALES Y METODOS En IPRM equidistantes 4 mm del plano sagital medio de 64 sujetos femeninos y 65 masculinos sin diagnóstico de enfermedad mental ni neurológica, se midieron con el programa Scion Image for Windows la SCC y, en la misma imagen, la SLPF comprendida entre el borde anterior del cerebro y la perpendicular a la línea que pasa por los puntos más distantes del borde ventral del cuerpo calloso en su intersección con el borde dorsal del genu. Para cada caso y hemisferio se calculó la relación SLPF/SCC. Las relaciones se agruparon por sexo, rangos de edad (21-40; 41-60 y 61-84 años) y hemisferio y se calcularon las medias +/- ES. Para el estudio estadístico se usó ANOVA. Se determinó para cada sexo el coeficiente de correlación de Pearson (r) entre edad (21-84 años) y valores de SLPF/SCC de cada hemisferio. RESULTADOS Las relaciones SLPF/SCC (media +/- ES) derecha e izquierda en el grupo femenino y masculino son significativamente menores ($p<0.01$ ANOVA) al incrementarse los rangos de edad. Las r de Pearson ($p<0.01$) entre edad (21-84 años) y SLPF/SCC derecha e izquierda son en el grupo femenino -0.65 y -0.62 y el masculino -0.61 y -0.60, indicando correlación inversa entre las variables. CONCLUSION La significativa disminución con el incremento de la edad en ambos sexos de la relación entre la superficie correspondiente al lóbulo prefrontal (medida entre reparos anatómicos confiables) y la superficie del cuerpo calloso en la misma imagen de cada hemisferio es indicativa de que la superficie del lóbulo prefrontal es la que sufre mayor deterioro relativo.

213 (46) EVALUACIÓN DEL EFECTO FOTOTÓXICO INDUCIDO POR LUZ AZUL EN CÉLULAS HUMANAS DEL EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA

Agustina Alaimo[1]; Roxana Mayra Gorojod[1]; Soledad Porte Alcon[1]; Jimena Hebe Martínez[2]; Mónica Lidia Kotler[1]
Laboratorio de Apoptosis en el Sistema Nervioso y Nano-Oncología. Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. IQUIBICEN-CONICET[1] Departamento de Química Biológica. FCEN-UBA. IQUIBICEN-CONICET[2]

La degeneración macular asociada con la edad es la principal causa de ceguera en personas de +60 años. Su etiología es multifactorial, interviniendo tanto factores genéticos como ambientales. Entre los últimos, se halla la exposición prolongada a la alta energía de la luz azul, un componente de la luz solar y de fuentes de nuestro entorno (ej.dispositivos electrónicos). En la DMAE seca, se observan áreas del ojo con pérdida del epitelio pigmentario de la retina (EPR) y deterioro de los fotorreceptores. Si bien esto último causa la pérdida de la visión, la patogénesis inicial involucra la degeneración del EPR. Objetivo: estudiar la fototoxicidad de la luz azul en la retina in vitro. Resultados: Células humanas del EPR (ARPE-19) se iluminaron con una fuente de diodos emisores de luz (LED) azul (λ=450nm; 1,5mW/cm^2)

durante períodos de tiempo cortos. La citotoxicidad se evaluó por ensayo de MTT, obteniéndose los siguientes valores de viabilidad celular: 98±4%(30 seg), 86±1%(60 seg) ($p<0,01$) y 94±1%(5 min) vs control sin irradiar. Empleando Lysotracker Red (LR)(100nM), se detectó un aumento en la densidad y tamaño de las vacuolas ácidas en las células iluminadas. Además, se observaron eventos indicativos de daño en la membrana lisosomal (marca difusa del LR). Las mitocondrias se visualizaron mediante tinción con Mitotracker Red (150nM). Las imágenes confocales reconstruidas en 3D (Huygens SW) permitieron visualizar en detalle cambios morfométricos en estas organelas. La luz azul produjo disrupción de la red mitocondrial tubular, favoreciendo el aumento de células con mitocondrias en forma de corpúsculos esféricos ($p<0,05$). Aún más, se constataron signos indicativos de disipación del $\Delta\phi m$. Conclusiones: Los resultados obtenidos constituyen el punto de partida en el estudio de los mecanismos de control de calidad mitocondrial y su conexión con la vía autofágica-lisosomal a fin de identificar posibles blancos terapéuticos involucrados en la supervivencia del EPR.

214 (52) POSIBLE RESTABLECIMIENTO POR ÁCIDO FÓLICO DE LAS ALTERACIONES COMPORTAMENTALES INDUCIDAS POR DOSIS NO TÓXICAS DE TE EN LA RATA

Silvia G. Ratti[1]; Edgardo O. Alvarez[0]
Lab Neuropsicof Exptl, IMBECU[1]

Anteriormente se encontró que ZnTe administrado crónicamente en dosis bajas a ratas madre, modifica la exploración lateralizada y las interacciones sociales de sus hijos en la etapa prepuberal. Estos cambios se asociaron a pérdida de la metilación del ADN hipocampal. Dado que el ácido fólico (AcFol) es un dador de grupos metilo, el objetivo del presente trabajo fue evaluar si este podría restaurar las alteraciones conductuales inducidas por el Te. Para ello, se trabajó con ratas prepuberales provenientes de: ratas-madre sin tratamiento (Control, n=11); ratas madres expuestas a 0.3 µg/L de ZnTe disueltos en el agua de beber después de la fecundación durante la preñez, lactancia y período prepuberal (ZnTe, n=12) y ratas madre expuestas a 0.3 µg/L de ZnTe y 2.3 mg/L de AcFol (AcFol+ZnTe, n=10). Al día 30, los hijos de los tres grupos se sometieron individualmente a la Prueba de Exploración lateralizada (LDHB, 3 min)) y la de Interacción Social Intruso-Residente (IS, 5 min). Toda la actividad conductual se midió por un contador digital de eventos (2 Cuentas/seg). Los resultados en el LDHB mostraron que el 90% de los controles presentaron exploración preferencial a la izquierda (71±8 Vs 41±4 C/3min, $p< 0.01$, Izq Vs Der). En el grupo tratado con ZnTe, esta lateralización desapareció (38±5 Vs 33±7 C/3min, Izq Vs Der, n.s.) y solo el 40% de los animales conservaron exploración lateralizada ($p< 0.01$, Vs control). En los animales tratados con AcFol y ZnTe, se observó lateralización exploratoria (63±6.3 Vs 28.5±6.7 C/3min, $p< 0.01$, Izq Vs Der) y el 100% presentó lateralización izquierda. En la prueba de IS, la latencia de interacción aumentó significativamente en el grupo ZnTe, comparado con el Control (42.5±26 Vs 13±3 C/3min, $p< 0.01$) y fue normal en el grupo AcFol+ZnTe (12.5±3.8 C/3min). En conclusión: los resultados respaldan la idea que el AcFol restaura las alteraciones conductuales inducidas por el Te.

215 (67)EL TRATAMIENTO CON PROGESTERONA MODULA LA EXPRESIÓN ESPINAL DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN Y FISIÓN MITOCONDRIAL EN UN MODELO DE DOLOR NEUROPÁTICO CENTRAL

María Celeste Raggio; Natalia Sol Adler; María Florencia Coronel; Susana Laura González
Instituto de Biología y Medicina Experimental

El desbalance entre los procesos de fusión y fisión mitocondrial y el estrés oxidativo son eventos que podrían estar implicados en el desarrollo de dolor neuropático. En este trabajo utilizamos un modelo animal que desarrolla dolor crónico central para estudiar los cambios temporales en la expresión de las isoformas de la mitofusina (Mfn1 y Mfn2) y de la proteína asociada a dinamina (Drp1), moléculas que regulan los procesos de fusión y fisión mitocondrial respectivamente, y su modulación por progesterona (PG), como potencial estrategia para prevenir el dolor neuropático. Ratas macho Sprague-Dawley controles (C) o con hemisección espinal se inyectaron diariamente con PG (16 mg/kg sc; HX+PG) o vehículo (HX). La conducta neuropática (alodinia) se evaluó utilizando los tests de von Frey y Choi. Los animales se sacrificaron a diferentes momentos post lesión (6h, 1d o 28d) y los niveles de ARNm de Mfn1, Mfn2 y Drp1 se determinaron por RT-PCR en tiempo real en el asta dorsal espinal. La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) se evaluó *in vivo* por inyección intratecal del marcador Mitotracker Red CM-H_2ROS, que fluoresce al ser oxidado. En los animales HX se observó una disminución del 50% en la expresión espinal de Mfn2 ($p<0.05$ vs C) y aumentos significativos en la expresión de Drp1 ($p<0.01$ vs C) y de Mfn1 ($p<0.05$ vs C) 6h post lesión, y la presencia de marca fluorescente en neuronas del asta dorsal, indicativo de la presencia de ROS, 1d luego de la injuria. Los animales HX+PG presentaron niveles de Mfn2 significativamente elevados con respecto al grupo HX ($p<0.01$) a las 6h, una disminución de Drp1 a 1d ($p<0.05$ vs HX) y no desarrollaron conductas alodínicas a 28d. Estos resultados sugieren que PG, modulando mecanismos espinales asociados a la disfunción de la dinámica mitocondrial y a la producción de ROS, puede ofrecer una promisoria alternativa terapéutica para prevenir el dolor crónico post lesión espinal (PIP CONICET 576, Fundación René Barón).

216 (108) ESTUDIO DE LOS EFECTOS INDUCIDOS POR EL FRAGMENTO DEL PÉPTIDO β-AMILOIDE 25-35 EN PROGENITORES NEURONALES DERIVADOS DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS

Verónica A Furmento; M. Soledad Rodríguez Varela; Guillermo Videla Richardson; Nicolas Dimopoulos; Leonardo Romorini; M. Elida Scassa; Gustavo Sevlever
Laboratorio de Biología del Desarrollo Celular - FLENI

La enfermedad de Alzheimer es un proceso neurodegenerativo del sistema nervioso central que provoca deterioro de las funciones cognitivas. Su base patogénica se asocia a la formación masiva de agregados proteicos como las placas seniles cuyo principal componente es un péptido hidrofóbico de 39-43 aminoácidos (ß-amiloide, ßA), y los ovillos neurofibrilares. El cerebro adulto conserva la capacidad de generar nuevas neuronas a partir de células madre/progenitores neuronales (PN) que se integran a las redes preexistentes en un proceso conocido como "neurogénesis". Sin embargo, estos PN no constituyen una fuente de fácil accesibilidad. Por esto, la generación de PN a partir de células madre embrionarias humanas (CMEh) permite contar con una valiosa herramienta para dilucidar los mecanismos que conllevan a la neurodegeneración. Con el objetivo de estudiar los efectos desencadenados por el fragmento del péptido ß-amiloide 25-35 ($ßA_{25-35}$), generamos PN a partir de la diferenciación dirigida de la línea de CMEh, WA-09. Los PN se caracterizaron fenotípicamente mediante FACS e inmunofluorescencia ($CD133^+$, $Nestina^+$, Neurofilamento liviano$^+$ y Doblecortina$^+$) y además, se diferenciaron a neuronas $Tuj1^+$, Neurofilamento liviano$^+$, $MAP2^+$ y $MAP5^+$. Mediante ensayos de XTT/PMS encontramos que 40 µM de $ßA_{25-35}$ produjo una disminución del 20% ($p<0,05$, n=3) en la viabilidad de los PN luego de 6 días de tratamiento. Asimismo, los PN incubados en las mismas condiciones experimentales mostraron un mayor porcentaje de núcleos picnóticos y un aumento del 30% ($p<0,001$, n=3) de oligonucleosomas citoplasmáticos resultantes de la fragmentación del ADN. Análisis preliminares de RT-qPCR no revelaron diferencias significativas entre los niveles de expresión de los transcriptos de los reguladores de apoptosis Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, Puma, Bax y Bim luego de 6 días de incubación con $ßA_{25-35}$. Estos resultados sugieren que el péptido $ßA_{25-35}$ ejercería un potencial efecto neurotóxico en los PN.

217 (109) LA CERAMIDA-1- FOSFATO ESTIMULA LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS GLIALES DE LA RETINA

Marcela Vera[1]; Facundo H. Prado Spalm[2]; M. Victoria Simon[2]; Nora P. Rotstein[1]
INIBIBB-CONICET[1] UNS-INIBIBB[2]

Las enfermedades proliferativas de la retina son causas principales de disfunción visual. Las células gliales de Müller (CGM), principal tipo glial en la retina, se activan ante cualquier daño a la retina y originan la gliosis reactiva, con una proliferación y migración anómalas que contribuyen a la disfunción visual. Esclarecer los mecanismos y moléculas que regulan la migración glial es de vital importancia. Nuestro laboratorio investiga el rol de un nuevo grupo de moléculas señal, los esfingolípidos, en estos procesos. Recientemente establecimos que la esfingosina-1-fosfato (S1P) estimula la migración glial. Otro esfingolípido, la ceramida-1-fosfato (C1P),regula la diferenciación, proliferación y migración en múltiples tipos celulares, y demostramos que promueve la supervivencia, proliferación y diferenciación de los fotorreceptores en la retina. Investigamos ahora si la C1P también regula la migración glial. Utilizando cultivos gliales puros de retina de rata, mediante la "técnica de la herida", determinamos que el agregado exógeno de C1P (5µM) promueve la formación de lamelipodios en las CGM y aumenta de manera significativa su migración respecto a los controles.Como las CGM también migran en los controles al inducir la herida, evaluamos si esta migración involucra la síntesis endógena de C1P. El análisis por PCR demostró que tanto las CGM como las neuronas de retina expresan ceramida quinasa (CerK), enzima que sintetiza C1P. El agregado de NVP231, un inhibidor de la CerK, disminuye la migración glial en los cultivos controles, lo que sugiere que las CGM producen C1P para estimular su migración. Indagamos las vías involucradas en dicha migración. La inhibición de las vías de PI3K y ERK/MAPK (con LY294002 y U0126, respectivamente),disminuye la migración glial, en cultivos controles y tratados con C1P. Estos resultados sugieren que la C1P es una de las señales involucradas en la migración de las CGM, a través de la activación delas vías de PI3K y ERK/MAPK.

218 (128) CARACTERIZACIÓN DE LOS AFERENTES GLOSOFARÍNGEOS COMO RUTA DE LA COMUNICACIÓN NEUROINMUNE ENTRE LA CAVIDAD ORAL Y EL CEREBRO

Lucas Marafetti[1]; Virginia Garcia Ceriani[1]; Pablo Antonio Scacchi Bernasconi[12]; Horacio Romeo[1]
Pontificia Universidad Catolica Argentina Facultad de Ciencias Médicas[1] Universidad de Buenos Aires. Facultad de Medicina[2]

Las infecciones en el tracto respiratorio superior así como las correspondientes a las de cavidad oral constituyen un problema común en práctica médica. En el transcurso de infecciones locales que tienen lugar en la cavidad oral, dicha información inmune llega al cerebro donde se generaran las respuestas homeostáticas agudas para enfrentarla. Datos experimentales han sugerido que son precisamente los aferentes glosofaríngeos quienes desempeñan un rol importante como ruta de comunicación neuroinmune entre un foco de infección periférica y cerebro. Por ejemplo, la sección quirúrgica bilateral de los nervios glosofaríngeos suprime marcadamente la respuesta febril ante una infección local de la cavidad oral. En este trabajo nos propusimos investigar si inmunoestimulaciones experimentales locales en la cavidad oral provocan la activación de las neuronas sensoriales alojadas en el ganglio glosofaríngeo. Se empleó la técnica de hibridación in situ radiactiva utilizando como marcador de activación neuronal una ribosonda para c-fos mARN. Bajo leve anestesia, las ratas fueron inyectadas en el paladar blando con compuestos inmunoestimuladores, los animales se sacrificaron 40 min después, se disecó el complejo ganglio nodoso-glosofaríngeo-yugular y procesó histológicamente. Tanto la inyección de lipopolisacárido (LPS) como de interleuquina 1 (IL-1) provocan un marcado incremento de la expresión de mARN para c-fos en las neuronas de los ganglios glosofaríngeos. Inyecciones de solución salina estéril apenas modifican la expresión basal de mARN para c-fos mientras que la sección microquirúrgica de los nervios suprime toda expresión ante cualquier inmunoestimulación en la cavidad oral. Los componentes eferentes (parasimpáticos) no están involucrados en esta comunicación neuroinmune. Los datos aportados por estos estudios moleculares confirman la caracterización de los aferentes glosofaríngeos como una ruta de comunicación neuroinmune.

219 (140) LA PROGESTERONA BLOQUEA LA APOPTOSIS DE PRECURSORES DE OLIGODENDROCITOS EN LA MÉDULA ESPINAL LESIONADA

Ignacio Jure[12]; Florencia Labombarda[123]; Susana Gonzalez[123]; Alejandro Federico De Nicola[123]
IByME[1] Laboratorio de bioquímica neuroendócrina. IByME. CONICET[2] Departamento de bioquímica humana. FMED. UBA[3]

Una de las consecuencias de las lesiones en la médula espinal (SCI) es la desmielinización, producida por la apoptosis de oligodendrocitos y por el fracaso posterior del proceso de remielinización. En los últimos años la progesterona (PG) ha surgido en varios trabajos como un promisorio agente neuroprotector y remielinizante. En este sentido, hemos demostrado previamente que la PG es capaz de aumentar el número de precursores de oligodendrocitos (OPC) luego de 3 días de lesión completa de la médula espinal. En este trabajo nos propusimos estudiar el mecanismo por el cual la PG aumenta el número de OPC luego de SCI en ratones. Mediante inmunohistoquímica observamos que la densidad de OPC aumenta luego de 24 y 48 h post-injuria con respecto a los animales controles (CTL) ($p<0.001$ CTL vs SCI, ANOVA dos vias). En los animales tratados con PG (16mg/kg/día) el número de OPC aumentó un 50% más que el obtenido en los animales SCI ($p<0.001$ SCI vs SCI+PG ANOVA dos vías). En los animales knock out para el receptor clásico de PG (PRKO), la PG no modificó la densidad de los OPC. Luego estudiamos si la PG podría estar aumentando el número de OPC mediante la inhibición de la apoptosis de estas células. Para tal fin realizamos un ensayo de Tunel y un estudio de colocalización mediante microscopía confocal utilizando un anticuerpo anti-Ng2 (marcador de OPC). Los resultados mostraron que luego de 48 h post-injuria un 40% de las células Ng2 totales fueron apoptóticas (tunel+/Ng2+). Cuando los ratones recibieron PG se observó que sólo el 20% de los OPC sufrieron apoptosis ($p<0.05$ SCI s SCI+PG, ANOVA una vía). En los animales PRKO, la PG no disminuyó el porcentaje de OPC apoptóticos. Estos datos nos permiten concluir que la PG vía su receptor clásico podría estar favoreciendo el programa de remielinización mediante la inhibición de la apoptosis de los OPC.

220 (165) DISTRIBUCIÓN CORTICAL DE INTERNEURONAS GABAÉRGICAS CALBINDINA POSITIVAS EN PACIENTES CON EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL TRATADOS CON CIRUGÍA DE LA EPILEPSIA

Andres Acuña[1]; Konopka Hector[3]; Escobar Erica[3]; Seoane Eduardo[2]; Kochen Silvia[2]; Loild Fabin[1]; D'alessio Luciana[1]
IBCN[1] Centro de Epilepsia, Hospital Ramos Mejía y Hospital el Cruce, Buenos Aires, Argentina[2] Hospital Moyano, Servicio de Patología, Buenos Aires, Argentina[3]

Introducción y objetivos: La calbindina es una proteína ligadora de calcio que en la corteza cerebral se expresa principalmente en una subpoblación de interneuronas gabaérgicas localizadas en la capa II y III. Se postula que en la epilepsia del lóbulo temporal (ELT) existen alteraciones en circuitos sinápticos que involucran al sistema inhibitorio gabaérgico. El objetivo del presente trabajo fue determinar la inmunorreactividad para calbindina en la corteza temporal de pacientes con ELT resistente que fueron operados (lobectomía temporal anterior). Materiales y métodos: Secciones histológicas de cortezas temporales de pacientes con ELT resistente y esclerosis del hipocampo (EH) operados fueron fijadas y procesadas mediante inmunoperoxidasa para calbindina. Material de archivo de cortezas temporales post mortem normales fueron procesados simultáneamente. Se realizó un análisis cuantitativo de la inmunoreactividad para calbindina mediante el programa de imagen computarizado (imagen J). Se utilizaron el test de Student y el coeficiente de correlacion de Pearson como pruebas estadísticas. Resultados: Se incluyeron 14 pacientes con ELT resistente y 5 controles postmortem. Los pacientes con ELT presentaron un área reactiva de menor tamaño con una menor intensidad de reacción para calbindina en la capa II ($p<0,05$). Encontramos una correlación negativa ($r = -0,72/p<0,001$) entre el número total de neuronas CB-IR y el tiempo de evolución de la epilepsia.

Conclusiones: Una menor expresión cortical de calbindina en los pacientes con ELT se correlacionó con un mayor tiempo exposición a las crisis. Estos cambios podrían estar relacionados con la hiperexcitabilidad cortical. Futuros estudios con técnicas de doble marcación permitirán confirmar estos hallazgos preliminares.

221 (190) FACTORES EPIGENETICOS Y DE TRANSCRIPCIÓN INVOLUCRADOS EN LA ABSTINENCIA A LA NICOTINA

Antonella Pisera Fuster; Ramon Bernabeu
IFIBIO HOUSSAY

Ha sido sugerido que los efectos reforzantes de la nicotina son potenciados por periodos cortos de abstinencia. Generalmente, la abstinencia se estudia mediante la administración continua durante varios días, quitando luego la droga y evaluando sus efectos. Considerando que el síndrome de abstinencia puede prolongarse por largos periodos de tiempo, siendo una de las principales causas de la reincidencia al consumo, y existiendo evidencias de que en los procesos de largo plazo, como la adicción y las memorias, parecen participar mecanismos que alteran la estructura de la cromatina, decidimos estudiar ciertos factores epigéneticos en animales abstinentes luego de ser expuestos durante el día a la nicotina y sin ninguna droga durante la noche.Para esto se implementó, en un modelo de pez cebra, una exposición crónica continua y otra intermitente, durante 14 días seguida por un periodo de abstinencia de 5 días, antes y después del cual se analizó la expresión de factores epigenéticos y de transcripción por la técnica de PCR semicuantitativa.La exposición intermitente en comparación con la exposición crónica presento una expresión diferencial en el caso de DNMT1, TET1, Gadd45, HDAC1 y SIRT1, no presentando cambios en Pitx3 y Egr1. Dichos factores han sido involucrados en procesos de plasticidad sináptica de larga duración, lo que sugiere que el tratamiento intermitente provoca un efecto más duradero y estable que la administración crónica. Esto sugiere que este modelo permitiría alcanzar una mayor similitud fisiológica con lo que ocurre en humanos. Estos resultados demuestran la teoría de que los periodos breves de no consumo de las drogas de abuso son un factor facilitador de la transición de un uso casual al consumo compulsivo.

222 (405) EFECTO DEL ÁCIDO LIPOICO EN EL NÚCLEO GENICULADO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE GLAUCOMA

Agustina Peverini; Claudia G Reides; Romina M Lasagni Vitar; Fabián S Lerner; Sandra M Ferreira; Susana F Llesuy
Cátedra de Química General e Inorgánica. IBIMOL, UBA-CONICET. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA

El ácido lipoico (AL) es uno de los más eficaces atrapadores de especies activas del oxígeno capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. Regenera las vitaminas C y E, aumenta las concentraciones intracelulares de glutatión y provee regulación redox de proteínas y factores de transcripción. El objetivo de este trabajo fue evaluar el rol protector del AL frente al daño oxidativo en el núcleo geniculado en un modelo de glaucoma experimental. Se trabajó con 4 grupos de ratas Wistar (3 meses): control, glaucoma, glaucoma tratado con 50 mg/ kg y otro con 100 mg/kg de peso de AL. El AL fue administrado por vía i.p. durante 7 días postquirúrgicos. En el día 7 los animales fueron sacrificados y se les extrajo el núcleo geniculado. Se realizó un homogeneizado y se determinaron los siguientes parámetros: lipoperoxidación (TBARS), capacidad antioxidante total (TRAP), las actividades de tioredoxina reductasa (TR) y glutatión peroxidasa (GPx). Los resultados muestran un aumento del 27% en los TBARS ($p<0,05$), y del 70% en la GPx ($p<0,05$), mientras que una disminución del 49% en el TRAP ($p<0,05$) y un 46% la TR ($p<0,01$) en el grupo glaucoma comparado con el grupo control. La administración de 50 mg/kg de AL produce una disminución significativa de los TBARS (31%, $p< 0,05$), no generando cambios en los otros parámetros evaluados comparado con los animales glaucomatosos. La dosis de 100 mg/kg de peso produjo un aumento del 517% en el TRAP ($p<0,001$) y un aumento del 52% ($p<0,01$) de la TR. Los TBARS no se modificaron significativamente como tampoco la GPx, comparados con los animales glaucomatosos. En conclusión: la dosis de 100 mg/ kg de peso pareciera ser más eficaz para proteger del daño oxidativo generado por el glaucoma en el núcleo geniculado. La terapéutica del glaucoma podría contemplar el uso de AL como una posible estrategia para la neuroprotección, considerando que el daño glaucomatoso se extiende a nivel cerebral más allá de la retina y del nervio óptico.

570 (480) EFECTO DE LA SEPARACIÓN MATERNA TEMPRANA SOBRE LA ACTIVACIÓN DE ESTRUCTURAS NERVIOSAS QUE REGULAN LA RESPUESTA DE ESTRÉS CRÓNICO EN RATAS TRATADAS CON TIANEPTINA

Verónica Trujillo; Patricia E. Durando; Marta M. Suárez
Univ. Nac. de Cordoba - Fac. de Cs. Exactas Fisicas y Naturales - Lab. De Fisiología Animal

El estrés crónico puede producir la desregulación del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal (HHA) y del sistema de recompensa que controla la conducta hedónica. Además, eventos de la vida temprana pueden generar alteraciones persistentes en circuitos neuronales que controlan la respuesta de estrés y la conducta emocional en el adulto. Nuestro objetivo fue estudiar si la separación materna temprana (SMT), el estrés crónico variable (ECV), o la combinación de ambos, producen cambios en la actividad neuronal de estructuras que participan en la regulación de la respuesta de estrés y del circuito de recompensa mesocorticolímbico. Además, se evaluó si el antidepresivo tianeptina (10 mg/ Kg) revierte los efectos de la SMT y del ECV. Se utilizaron ratas Wistar machos, separadas de la madre diariamente 4,5 hs durante 3 semanas y sometidas a 24 días de ECV en la adultez. La expresión de Fos (marcador de actividad neuronal) fue determinada por inmunohistoquímica en corteza prefrontal medial (CPFm), núcleo accumbens (NAc), núcleo paraventricular hipotalámico (NPV), hipocampo dorsal, amígdala y área tegmental ventral (ATV). El ECV aumentó la ir-Fos en el NPV, pero la disminuyó en CA1 y CA2 del hipocampo (inhibidor del NPV) y en la CPFm (perteneciente al circuito de recompensa) ($p<0,05$). Además, la SMT aumentó la ir-Fos del NPV y de la amígdala (activadora del NPV) ($p<0,05$). Mientras que, en CA3, tanto el ECV como la SMT aumentaron la ir-Fos ($p<0,05$) pero la aplicación de ambos tratamientos produjo niveles de ir-Fos similares a los controles. Tianeptina disminuyó, en el ATV, la ir-Fos en los controles ($p<0,05$). Nuestros resultados indican que el ECV y la SMT aumentan la activación del eje HHA. Mientras que en CA3, el efecto del estrés fue dependiente de la condición de crianza. Además, la menor activación de la CPFm de ratas con ECV podría relacionarse con una desregulación de las conductas emocionales. Por último, tianeptina no afectó la actividad neuronal de estas estructuras.

ENDOCRINOLOGÍA 1

223 (23) LA SOBRE-EXPRESIÓN DEL REβ INHIBE LA EXPRESIÓN DEL REα ENDÓGENO MODULANDO LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES ADENOHIPOFISARIAS GH3

Pérez, Pablo Aníbal; Petiti, Juan Pablo; Sabatino, María Eugenia; Picech, Florencia; Guido, Carolina Beatriz; De Paul, Ana Lucía; Torres, Alicia Inés; Gutierrez, Silvina
INICSA-CONICET

En estudios previos mostramos que el REβ inhibe la proliferación celular adenohipofisaria mediante la modulación de reguladores del ciclo celular como ciclina D1 y p21. A continuación y considerando estos antecedentes nos propusimos dilucidar si el REβ modula la expresión del REα contribuyendo así al mantenimiento del balance proliferativo adenohipofisario. Se utilizaron cultivos de células adenohipofisarias normales y tumorales GH3 (GH3β-). Esta línea celular fue transfectada para la sobre-expresión del REβ (GH3β+). Se realizaron estímulos con 10 nM de E2, PPT (agonista del REα) y DPN (agonista del REβ) por 72h. Se determinó la proliferación celular (con BrdU), el contenido de ADN

(con yoduro de propidio) y la expresión de REα y β por western blot (WB), inmunofluorescencia (IF) y citometría de flujo. Análisis estadístico: Anova-Dunnet. La sobre-expresión del REβ en células GH3 en condiciones basales inhibió la proliferación celular alrededor del 40% y disminuyó significativamente la población en fases S+G_2/M del ciclo celular. Este efecto inhibitorio no mostró cambios luego del tratamiento con E2, PPT o DPN. En GH3β+ se observó una reducción significativa de la expresión del REα endógeno, la cual se mantuvo en niveles similares luego de la estimulación con E2, PPT o DPN. La expresión del REβ en GH3β+ no varió con ninguno de los tratamientos aplicados. En células adenohipofisarias normales se observó por IF una inmunomarcación difusa citoplasmática del REβ en el 16,97 ± 2,3% de las células, de las cuales el 91,48 ± 2,64% expresaron además el REα (15,61 ± 2,42% del total de células). Nuestros resultados muestran que el REβ inhibe la expresión del REα modulando así la proliferación celular adenohipofisaria de manera ligando independiente. Además, la elevada co-expresión de los REα y β sugiere un mecanismo de acción integrado de ambos subtipos de RE en sus efectos biológicos sobre las células adenohipofisarias.

224 (39) EFECTO MODULADOR DE LOS ANDRÓGENOS SOBRE LA FUNCIÓN ENDÓCRINO-METABÓLICA Y LA CAPACIDAD ADIPOGÉNICA DEL TEJIDO ADIPOSO RETROPERITONEAL

María G Zubiría[1]; Ana Alzamendi[1]; Andrea Portales[1]; Amanda Rey[1]; Eduardo Spinedi[2]; Andrés Giovambattista[1]
Instituto Multidisciplinario de Biología Celular-IMBICE[1] Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada-CENEXA[2]

Los andrógenos actúan regulando diversas funciones del tejido adiposo (TA). En el presente trabajo evaluamos los efectos de la ausencia de testosterona (T) desde edad prepuberal en ratas macho sobre la función del TA. Para ello se utilizaron dos grupos: control (CTR) y orquidectomizados a los 27 días de vida (ODX). Al registrarse el peso y consumo de alimento diarios el grupo ODX resultó hipofágico y con menor peso corporal (P<0,05 vs. CTR), por lo incluimos el grupo CTR "*pair fed*" (CTR-PF). A la edad de 60 días se disecaron y pesaron los TA inguinal (TAI) y retroperitoneal (TARP), para cuantificar (qPCR) los niveles de ARNm de adiponectina (Adipoq) y lipoproteinlipasa (LPL). Se determinaron las concentraciones circulantes de glucosa (Glu), insulina (Ins), triglicéridos (TG) y leptina (Lep). Luego estudiamos el efecto directo del exceso de T *in vitro* sobre el potencial adipogénico de las células precursoras adipocitarias (CPAs) normales. Para ello aislamos células de la fracción estroma vascular (FEV) de ratas macho adultas y se cultivaron en ausencia o presencia de T (0,01-0,1 µM, 48 horas); en ellas cuantificamos los ARNm de marcadores del potencial adipogénico: PPARγ2, Zfp423, CD34 y Pref-1. Los resultados mostraron que los niveles de TG fueron menores y los de Ins mayores en ODX (P<0,05 vs. CTR y CTR-PF), sin modificarse Glu y Lep. No hubo diferencias en el porcentaje de TAI y TARP, sin embargo, los ODX mostraron niveles de ARNm menores de Adipoq (P<0,05 vs. CTR) y de LPL (P<0,05 vs. CTR y CTR-PF) en TARP. Finalmente, las células FEV cultivadas con T arrojaron niveles mayores de ARNm de CD34, PPAR2 y Zfp423, y menores de Pref-1 (P<0,05 vs. sin T). Estos resultados sugieren que ambas condiciones, la falta *in vivo* (ODX) y el exceso *in vitro* de T, modifican significativamente la función del TARP; induciendo, respectivamente, una clara disfunción endocrino-metabólica y un aumento en la competencia adipogénica de CPAs (PIP 0198; PICT 2013-0930; FPREDM062013).

225 (147) EFECTOS DE LA HEMOOXIGENASA-1 SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE LEYDIG Y SU INTERACCIÓN CON HISTAMINA

Trinidad Raices[1]; Casandra Monzon[1]; Marcos Besio Moreno[1]; Omar Pedro Pignataro[12]; Elba Nora Pereyra[1]
Lab Endoc Molec y Transducción de Señales IBYME-CONICET[1] Depto de Qca Biológica, FCEN-UBA[2]

Previamente hemos demostrado que la inducción de hemooxigenasa-1 (HO-1) por hemina inhibe la esteroidogénesis basal y estimulada por hCG y dbAMPc. También, hemos reportado que HO-1 inducida por hemina inhibe el efecto estimulatorio de histamina sobre la esteroidogénesis mediado por los receptores H2 (RH2). Objetivos: Investigar el efecto de HO-1 sobre la proliferación de células de Leydig (CL) y su modulación por histamina. Métodos: Se utilizó la línea celular MA-10 de CL como modelo experimental. Se estudió la proliferación celular analizando la incorporación de ^{3}H-timidina y por el método de MTT. El ciclo celular se estudió utilizando citometría de flujo. Resultados: Se observó que HO-1 inducida por hemina inhibe la proliferación de CL de un modo concentración-dependiente, entre 10 y 50mM. Este efecto se ejerce a través de un arresto del ciclo celular en la fase G2/M. La incubación simultánea de CL con hemina y amthamine (agonista del RH2) 1µM revirtió el efecto estimulatorio observado con amthamine. Conclusiones: Los resultados sugieren que HO-1 inhibe la proliferación celular de CL y que este efecto no es revertido por histamina.

226 (56) EFECTIVIDAD DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-HORMONA GONADOTROFINA CORIÓNICA HUMANA (HCG) EN PREVENIR DISFUNCIONES REPRODUCTIVAS Y METABÓLICAS EN HEMBRAS TRANSGÉNICAS

Agustina Marcial Lopez[1]; Laura Daniela Ratner[1]; Guillermina Stevens[1]; Jagdish Gupta[2]; Kripa Nand[2]; Ricardo Saul Calandra[1]; Gursaran P Talwar[2]; Susana Beatriz Rulli[1]
IBYME-CONICET, Buenos Aires[1] The Talwar Research Foundation, N. Delhi, India[2]

La hormona gonadotrofina coriónica (hCG) es clave en la reproducción humana. Su receptor se encuentra en una amplia variedad de tejidos. Sus niveles se encuentran aumentados en situaciones patológicas, tales como tumores trofoblásticos y no trofoblásticos. Los ratones transgénicos portadores la subunidad β de hCG (hCGβ+) producen niveles elevados de hCG en forma crónica. Las hembras son infértiles, obesas, presentan niveles elevados de insulina, prolactina, andrógenos, progesterona, desarrollan prolactinomas y tumores mamarios. El objetivo del trabajo fue determinar la efectividad bioneutralizante de un anticuerpo monoclonal contra hCG (Pipp) en prevenir estas alteraciones fenotípicas. Hembras hCGβ+ fueron inyectadas i.p. con Pipp (300 µg/ratón/dosis) a las 5 semanas (hCGβ+Mab5s: día por medio durante una semana, seguido por una dosis semanal) y a las 16 semanas de edad (hCGβ+Mab16s: una dosis semanal). Se compararon con hembras hCGβ+ inyectadas con vehículo. Se realizaron estudios de fertilidad, peso corporal, ingesta, metabolismo glucídico y presencia de tumores a los 3-6 meses de edad. Las hembras hCGβ+Mab5s normalizaron el ciclo estral y recuperaron la fertilidad, no así las hCGβ+Mab16s. No se observaron diferencias en el peso corporal entre los grupos, pero sí mayor ingesta diaria en hCGβ+Mab5s (p<0.05). La curva de tolerancia a glucosa se normalizó en los grupos tratados (p<0.05). Todos los grupos mantuvieron aumentados los niveles de glucosa durante la curva de resistencia a insulina (p<0.05). Se previno el desarrollo de tumor hipofisario únicamente en el grupo hCGβ+Mab5s. En conclusión, el tratamiento aplicado con el anticuerpo monoclonal anti hCG fue más efectivo en revertir el fenotipo al ser administrado en hembras transgénicas jóvenes que adultas.

227 (177) COMPROMISO DEL EJE HIPÓFISO-OVÁRICO DE RATAS ADULTAS EXPUESTAS A DOS DOSIS DE BISFENOL A DURANTE ETAPAS TEMPRANAS DEL DESARROLLO

Nicolas Contrera Rolon[1]; G Busch[1]; Y Braunsteni[1]; E Gonzalez Sampaio[4]; MS Bianchi[2]; O Ponzo[1]; P Scacchi Bernasconi[1]; E Zotta[3]; R Reynoso[1]
Laboratorio de Endocrinología, Facultad de Medicina, UBA[1] Laboratorio de Neuroendocrinología, IBYME[2] Laboratorio de Fisiopatogenia.Fac. de Medicina UBA[3] Laboratorio Htal. Británico[4]

El bisfenol A (BPA) es uno de los disruptores endocrinos de mayor producción en la industria, utilizado en la fabricación de plásticos policarbonato, presentes en la mayoría de los envases

plásticos, resinas epoxi y selladores dentales. En trabajos previos hemos demostrado que la exposición a BPA en estadíos tempranos del desarrollo afectan el eje hipófiso-ovárico (EHO) de ratas prepúberes. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto del BPA sobre el EHO de ratas adultas expuestas al mismo durante la gestación y la lactancia. Se administró BPA en el agua de bebida en una dosis aproximada de exposición de 0.025 y 2.5 mg/kg/día a ratas madre y etanol 0.1% al grupo control. Las crías hembra fueron separadas de la madre a los 21 días de vida y sacrificadas a los 60 días de vida en diestro. Se evaluó peso corporal y el peso de ovarios. Se determinó: LH, (RIA mUI/ml), estradiol, testosterona (QLIA, pg/ml,nmol/l). Se realizó estudio histológico de cortes de tejido ovárico. El estudio del ciclo estral mostró que los animales tratados con la dosis baja y alta presentaban periodos prolongados en Diestro, y ciclos regulares en el 25% y 20% de los casos,respectivamente. El peso corporal se incrementó con la dosis baja,(C:293±4.4vs377±12, ***p<0.001), a dosis alta no se observaron cambios. Los pesos de los ovarios no mostraron cambios significativos. Los niveles de LH, estradiol y testosterona se incrementaron significativamente en animales expuestos a la dosis alta (0.6±0.07vs2.1±0.7, ***p<0.001, 6.7±0.8 vs 15±1.5, *p <0.05, 0.8±00.2vs1.3±0.13, p<0.05), mientras que a la dosis baja estradiol se incrementó significativamente (6.7±0.8 vs15±4.0, *p<0.05), LH mostró tendencia a disminuir y testosterona no mostró cambios. La histología mostró alteraciones en la foliculogénesis en los animales expuestos a la dosis alta. Los resultados sugieren que la exposición a dos dosis de BPA en estadíos tempranos del desarrollo afectan de manera diferente el EHO en la adultez.

228 (74) ACCIÓN DE LOS ESTRÓGENOS SOBRE LA EXPRESIÓN HIPOFISARIA DE LH Y FSH, Y SU RELACIÓN CON LA OVULACIÓN DURANTE LA GESTACIÓN EN LA VIZCACHA DE LAS LLANURAS DE SUDAMÉRICA (LAGOSTOMUS MAXIMUS)

Lorena Yankelevich[2]; Santiago Elas Charif[24]; Pablo Ignacio Felipe Inserra[24]; Sofía Proietto[2]; Noelia Paula Di Giorgio[34]; María Clara Corso[2]; Dalila Yael Ochman[2]; Victoria Lux-Lantos[34]; Julia Halperín[24]; Alfredo Daniel Vitullo[24]; Verónica Berta Dorfman[24]
CEBBAD, Universidad Maimónides[2] IBYME[3] CONICET[4]

La vizcacha de las llanuras de Sudamérica (*Lagostomus maximus*) presenta poliovulación natural y ovulación en la mitad de la gestación. Previamente describimos aumento de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) durante la preñez con cambios en su pulsatilidad. Objetivo: investigar la acción del estradiol (E2) sobre la expresión hipofisaria de LH y FSH, y su relación con la ovulación durante la gestación en la vizcacha. Utilizamos vizcachas no preñadas (NP) y NP ovulando (NPO), y gestantes con preñez temprana (PTem), media (PMed) y a término (PTer), (n=5/grupo). En animales NPO se estudió la pulsatilidad de LH durante 6 horas en medio con estradiol (E2), con el antagonista tamoxifeno (Tam) o con ambos, (n=5/grupo). Se realizó dosaje de LH por RIA y de E2 por ELISA, se estudió la expresión hipofisaria de los receptores de estrógenos alfa (REa) y beta (REb) por Western-blot y su localización por inmunohistoquímica. Los datos fueron analizados mediante test de T o ANOVA seguida del test de Newman-Keuls para determinar diferencias significativas (p<0,05). Se observó aumento significativo (S) en la expresión hipofisaria de REa y REb en NPO vs NP, mientras que durante la gestación, REa presentó aumento S en la PMed con respecto a PTemp y disminución S en PTer; mientras que REb mostró aumento S con el progreso de la preñez. Este perfil de expresión de los RE coincidió con los niveles séricos de estradiol y LH, mientras que el contenido hipofisario de FSH resultó nulo tanto en NPO como en PMed. La pulsatilidad de LH resultó alterada por efecto de Tam con disminución S en el número de pulsos y en la liberación total, mientras que el E2 no produjo diferencias S. Conclusión: los RE estarían directamente involucrados en la expresión de LH. La inhibición de la pulsatilidad por Tam reforzaría la idea de una dependencia directa por E2. El patrón de expresión de LH y FSH en la preñez media se correspondería con el observado en la ovulación (PIP-CONICET 0225/2011).

229 (93) AUTOINMUNIDAD TIROIDEA Y NIVELES DE TIROTROFINA ASOCIADOS A COMPLICACIONES DEL EMBARAZO EN LA MUJER EUTIROIDEA

Claudia Marisa Melillo[12]; Paola Claudia Prener[13]; María Olga Suescun[14]
Cátedra de Endocrinología-Facultad de Ciencias Exactas-UNLP[1] Instituto Médico Mater Dei La Plata[2] Hospital Especializado de Agudos y Crónicos San Juan de Dios La Plata[3] Instituto Multidisciplinario de Biología Celular IMBICE La Plata[4]

Los desórdenes de la función tiroidea son prevalentes en la mujer en edad reproductiva. En gestantes se asocian con riesgo de abortos espontáneos, parto pretérmino y menor crecimiento fetal. Además la autoinmunidad tiroidea se vincula a efectos adversos en el embarazo. El objetivo de este trabajo fue determinar el porcentaje de gestantes eutiroideas con Tirotrofina (TSH), en dos niveles del rango de referencia, con complicaciones en la gestación, evolución a patología tiroidea y títulos de autoanticuerpos. Se realizó un estudio transversal y retrospectivo en el primer trimestre de embarazadas eutiroideas, entre 2004 y 2014 en un área iodo suficiente, con edades entre 18 y 32 años. Se seleccionaron 580 gestantes con autoanticuerpos tiroideos (aa) positivos (EP) y 533 con anticuerpos negativos (EN). Se subdividieron en 2 grupos de acuerdo a los niveles de TSH (mUI/L) ≤ a 1.20 EP1 y EN1 y > a 1.20 EP2 y EN2. Las hormonas y aa se midieron por Fluorescencia y Quimioluminiscencia. Durante el embarazo el 7% de EP y el 4% de EN desarrollaron hipotiroidismo subclínico y clínico. El 5% de EP y 2% de EN evolucionó a Tiroiditis pos parto. En EP, el 63% mostró TSH entre 0.40 y 1.20 mUI/L y el 37% entre 1.20 y 2.50 mUI/L. En EN, el 80% corresponde a EN1 y el 20% a EN2. Los niveles medios de TSH no mostraron diferencias significativas entre EP1 vs EN1 y EP2 vs EN2. En cuanto a las complicaciones del embarazo, se constataron, abortos espontáneos: 13% en EP1, 20% en EP2, 6% en EN1 y 12% en EN2; y partos prematuros en el 5% de EP1, 8% de EP2, 2% de EN1 y 5% de EN2. En EP1 y EP2 los títulos de anticuerpos correlacionaron directamente con los niveles de TSH (Spearman, p<0.05). Nuestros resultados evidencian una marcada asociación entre los niveles de TSH, presencia de autoanticuerpos y complicaciones en mujeres embarazadas eutiroideas e indican la importancia de contar con valores de referencia trimestre específico y screening de la función tiroidea en el curso de la gestación.

230 (123) EXPRESIÓN DE RECEPTORES A HISTAMINA H4 EN CÉLULAS DE LEYDIG TUMORALES R2C Y TUMORES DE CÉLULAS DE LEYDIG HUMANOS

Alejandra Lucía Marcos[1]; Adriana María Belén Abiuso[1]; Alicia Belgorosky[2]; Marco Aurelio Rivarola[2]; Marcos Besio Moreno[1]; Omar Pedro Pignataro[1]; Esperanza Berensztein[2]; Carolina Mondillo[1]
Lab de Endocrinología Molecular y Transducción de Señales - IBYME- CONICET[1] Servicio de Endocrinología - Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan[2]

Los tumores de células de Leydig (TCL) son los más frecuentes de los tumores que se originan en las células somáticas del testículo. Aunque la etiología de los TCL es desconocida, diversos estudios apuntan a la sobreexpresión de CYP19 en las células de Leydig tumorales (CLT) y el aumento en la síntesis de estradiol (E2), que a su vez estimula la proliferación celular (PC). Si bien los TCL son normalmente benignos, en niños puede presentarse pubertad precoz, y cuando malignizan en el adulto no responden a la quimioterapia ni a la radioterapia. El receptor a histamina H4 (H4R) es considerado un blanco prometedor para el tratamiento de patologías autoinmunes, alergia, inflamación, y cáncer. Previamente reportamos la expresión de H4R en CLT MA-10 y demostramos que su activación conduce a una inhibición de la esteroidogénesis (ST) inducida por LH/hCG y de la PC. Dado que en las CLT MA-10 la ST se interrumpe a nivel de progesterona (P), en este trabajo extendimos nuestro estudio a las CLT R2C, que expresan CYP19 y sintetizan E2. También evaluamos la expresión de H4R en TCL *vs* testículos humanos

normales (THN). Metodología: Se estudió la expresión de H4R en las CLT R2C por Western blot y PCR en Tiempo Real. Los niveles de P y E2 se determinaron por RIA, y la PC se evaluó mediante incorporación de ^{3}H-timidina. Se estudió la expresión de H4R por inmunohistoquímica en 11 THN de cuatro grupos etarios (G): G1 (neonatal,n=2), G2 (infantil,n=4), G3 (juvenil, ausencia de CL,n=3) y G4 (puberal,n=2), y en 2 TCL (3,92 y 6,0 años de edad). Resultados: Se observó alta expresión de H4R en las CLT R2C y en los TCL, pero sólo en las CL de 3 THN, de G1, G2, y G4. No se detectó H4R fuera del intersticio. El tratamiento de las CLT R2C con el agonista H4R VUF8430 (V 1nM-10µM) inhibió de manera concentración dependiente la producción de P y E2, y la PC (V 10nM, p<0,05 *vs* C). Conclusión: Los resultados sugieren que H4R constituye un potencial blanco terapéutico para el tratamiento de TCL.

231 (207) EFECTO DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA ENZIMA CICLOOXIGENASA 1 (COX1) EN HÍGADO Y SU POSIBLE IMPLICANCIA EN EL DESARROLLO DE TUMORES HEPÁTICOS

Gregorio Juan Mc Callum; Giannina P. Micucci; Nadia V. Muia; Verónica G. Piazza; Daniel Turyn; Lorena González; Ana I. Sotelo; Johanna G. Miquet
IQUIFIB (UBA-CONICET) Fac. de Farmacia y BioQuímica, Depto. de Química Biologica

Estudios realizados en modelos animales y en humanos indican que la predisposición al desarrollo de tumores aumenta ante la exposición prolongada a la hormona de crecimiento (GH). En particular, ratones que sobreexpresan GH poseen mayor incidencia de tumores hepáticos. En este modelo encontramos exacerbadas vías de señalización que participan en la activación y expresión de las ciclooxigenasas (COX). Considerando que se han descrito niveles elevados de dichas enzimas en lesiones pretumorales y malignas, el objetivo del presente trabajo fue determinar el impacto que ejerce la exposición a niveles elevados de GH sobre la expresión de COX1 en hígado y su posible implicancia con el desarrollo de tumores hepáticos. Se determinó su contenido proteico en hígado por técnicas de inmunobloting e inmunohistoquímica. Se trabajó con ratones transgénicos que sobreexpresan GH de dos edades: adultos jóvenes, que presentan alteraciones preneoplásicas, y de edad avanzada, que desarrollan tumores hepáticos. Los niveles de la enzima fueron significativamente mayores en el hígado de los ratones transgénicos que en los normales, tanto en animales jóvenes como de edad avanzaday en ambos sexos (P<0,05; n=8-10). Sin embargo, al comparar la expresión de COX1 entre las zonas tumoral y no tumoral no se detectaron diferencias. Para evaluar si el aumento de COX1 en hígado se observa también si la exposición a la GH es de menor duración, se trataron ratones normales con la hormona mediante la implantación de bombas osmóticas durante 4 días. El tratamiento produjo un aumento significativo de COX1 (P<0,05; n=6)en ratones macho. Se puede concluir que la exposición a concentraciones elevadas de GH en ratones se asocia con un aumento en el contenido proteico de COX1 en hígado, que se puede detectar incluso ante un tratamiento corto con GH. Esto sugiere que podría tratarse de un evento temprano en el desarrollo de las alteraciones hepáticas que se asocian a la sobreexpresión de GH en roedores.

232 (407) LAS HORMONAS OVÁRICAS JUGARÍAN UN ROL FUNDAMENTAL EN LA REGULACIÓN DE LAS CÉLULAS STEM DE LA GLÁNDULA MAMaría. RESPUESTA DIFERENCIAL SEGÚN EL BALANCE DE LAS ISOFORMAS DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA

María Sol Recouvreux[1]; Laura Todaro[1]; Marina Simian[2]
Instituto de Oncologia Angel H Roffo[1] Universidad Nacional de San Martin[2]

Tanto la progesterona (P) como el estrógeno (E) juegan un rol preponderante en el desarrollo normal de la glándula maMaría. El receptor de P (PR) presenta dos isoformas, PRA y PRB y el balance adecuado entre ambas es necesario para una correcta respuesta hormonal. Con el objetivo de estudiar el rol de las isoformas del PR en la homeostasis de la población de células stem de la glándula maMaría, utilizamos un modelo de ratones transgénicos que sobreexpresan PRA o PRB. Hipotetizamos que la alteración en el balance PRA/PRB afectaría la expansión y autorenovación de las células stem maMarías. Demostramos previamente que los ratones PRB presentan un mayor porcentaje de células positivas para marcadores stem ($CD24^{+}/CD29^{+}$) y una mayor capacidad de formar mamoesferas comparado con PRA y WT. En este trabajo nos interesó estudiar el efecto de E, P y sus antagonistas sobre la población de células con características stem en los ratones PRA, PRB y WT. Con este fin planteamos 3 estrategias: 1. Depletar de E y P a los ratones mediante ovariectomía (OVX); 2. Tratar ratones intactos con el anti estrógeno ICI 182,780 (I); 3. Tratar con I o Tamoxifeno (T) cultivos en suspensión de células provenientes de animales intactos. La OVX llevó a un aumento significativo en el porcentaje de células $CD24^{+}/CD29^{+}$ tanto en WT como PR A (N=3; p=0,02), a pesar de este aumento se vio disminuida la capacidad de formación de mamoesferas. En cambio en ratones PRB estos parámetros no se vieron alterados. Al tratar las células en suspensión con T o I se observó una disminución significativa en el número de mamoesferas en PRA (N=3; p=0,001), no así en PRB. Por otra parte al tratar ratones PRA y WT con I se observó una disminución en el fenotipo hiperplásico de PRA (descripto previamente), que fue acompañado por una disminución en la formación de mamoesferas. Estos resultados indicarían que E y P tienen un rol fundamental en la regulación de la población stem de la glándula maMaría.

233 (504) ESTUDIO MOLECULAR EN PACIENTES 46,XX CON DESÓRDENES DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL

María S Touzon; Roxana Marino; Pablo Ramirez; Natalia Perez Garrido; Matías Juanes; Nora Saraco; Maríana Costanzo; Gabriela Guercio; Esperanza Berensztein; Marco A Rivarola; Alicia Belgorosky
Hospital de Pediatría Dr Juan P Garrahan SAMIC

Los desórdenes de diferenciación sexual (DSD) son condiciones congénitas en las cuales existe una discrepancia entre el sexo cromosómico y el fenotípico (genital o gonadal). Generalmente, los pacientes se presentan en el período neonatal con ambigüedad genital, dificultando la asignación inmediata de sexo, o durante la adolescencia cuando se evidencia el desarrollo sexual atípico. El análisis molecular es una herramienta clave para establecer el diagnóstico, permitiendo un manejo personalizado del paciente y pudiendo reducir significativamente el período de incertidumbre para las familias con respecto a la asignación del sexo de crianza de su niño. De todas formas, el mismo posibilita el diagnóstico sólo en el 20% de los casos. Objetivo: La caracterización molecular de pacientes con diagnóstico de DSD 46,XX mediante el análisis de un grupo de genes relacionados con la diferenciación sexual. Método: Se analizaron 14 pacientes con diagnóstico de DSD 46,XX, clasificados como DSD testicular (n:6) y DSD ovotesticular (n:8). La caracterización molecular se realizó a partir del estudio en ADN proveniente de sangre periférica: para los genes NROB1, FOXL2, RSPO1 y WNT4 mediante secuenciación automática de la región codificante y regiones intrónicas flanqueantes, y el número de copias de los genes SRY, SOX9, NROB1, NR5A1 y WNT4 se analizó por la técnica de MLPA. Resultados: No se detectaron mutaciones ni variaciones en el número de copias en los genes estudiados. Conclusión: Estos resultados indican que otros factores genéticos o ambientales estarían involucrados en el desarrollo de la patología. A fin de realizar el diagnóstico etiológico de los pacientes con DSD, se sugiere la implementación de técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) junto con la técnica de hibridación genómica comparada (CGH) permitiendo el análisis simultáneo de una mayor cantidad de genes y disminuyendo el costo y tiempo.

234 (533) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS RECEPTORES CLÁSICOS Y NO CLÁSICOS DE ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA, EN HIPÓFISIS DE RATA, POR ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA

María Andrea Camilletti; Erika Faraoni; Alejandra Abeledo; Graciela Diaz-Torga; María Cecilia Bottino
IBYME

Previamente demostramos que la ovariectomía (OVX) altera profundamente la expresión hipofisaria de los receptores clásicos y no clásicos de estrógenos y progesterona. Esto es seguramente provocado por la caída en los niveles de estradiol (E2) y progesterona (P4) que induce la OVX. Para profundizar este efecto, estudiamos la regulación que ejercen el E2 y la P4, a corto y largo plazo sobre la expresión de sus receptores. Se realizaron tratamientos agudos (1h, 2hs y 24hs) y crónicos (4 semanas), con E2 (valerato de E2, 0,2mg/kg, sc) o P4 (20mg/kg, sc) en ratas hembra Sprague Dawley adultas intactas. Se evaluó la expresión hipofisaria de los receptores clásicos y no clásicos de E2 y P4 por qRT-PCR. TRATAMIENTOS CON ESTRADIOL: el E2 regula NEGATIVAMENTE, tanto la expresión hipofisaria de sus propios receptores ERα, ERβ y GPR30 a todos los tiempos estudiados, como también de los receptores de membrana de P4: PGRMC1 y mPRα. Esto explica el marcado aumento que provoca la OVX en la expresión de los mismos. En cuanto a los PRs, el E2 indujo un significativo aumento en la expresión de PRB sólo a tiempos largos. TRATAMIENTOS CON P4: provocaron un aumento transitorio, significativo en la expresión del PRB a tiempo corto, seguido por una caída en la expresión de los mismos a partir de las 24hs. Los tratamientos largos alteraron la expresión de los ER (aumento en la expresión del ERα, inhibición de la expresión de ERβ). Concluimos que E2 y P4 regulan en la hipófisis la expresión génica de sus receptores. La disminución drástica de los niveles séricos de E2 y P4 inducidos por una OVX provocan un aumento en la expresión de los receptores de membrana, asociados a los efectos proliferativos y/o anti-apoptóticos de E2 y P4. Es así como un tratamiento crónico con E2 induce prolactinomas de mayor tamaño en hembras si las mismas son previamente OVX. Esto debe ser tenido en cuenta en aquellos tratamientos de reemplazo hormonal en mujeres que han sido sometidas a una OVX.

235 (566) EFECTOS DIFERENCIALES DE TESTOSTERONA Y TESTOSTERONA-BSA SOBRE CÉLULAS MUSCULARES LISAS PROSTÁTICAS

Nahuel Peinetti; Carolina Leimgruber; María Victoria Scalerandi; Amado Alfredo Quintar; Cristina Alicia Maldonado
Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Cs. Médicas, UNC. INICSA-CONICET

Las células musculares lisas de la próstata (CMLp) cumplen un papel primordial en el mantenimiento de la homeostasis glandular; estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que estas células son capaces de responder a estímulos inflamatorios dediferenciándose a miofibrobastos y secretando citoquinas, respuesta que es modulada por testosterona (T). La T puede interactuar tanto con receptores citosólicos como a través de receptores ubicados en la membrana celular. En este trabajo nos propusimos determinar la participación de receptores de andrógeno de membrana (RAm) en la modulación de la respuesta a LPS en CMLp. En primera instancia se evaluó la presencia de RAm mediante citometría de flujo y microscopía confocal, encontrando marcación positiva para el RAm en la superficie celular por ambas técnicas. A continuación analizamos la activación de ERK1/2 y Akt mediante western blot, luego de estímulos de 10-30 min con T o T-BSA (conjugado de T impermeable a la membrana plasmática). El aumento en la fosforilación de ERK1/2 y de Akt ($p<0,05$) demostró la funcionalidad de la señalización iniciada por T a nivel de membrana. Finalmente evaluamos el efecto de T o T-BSA sobre la secreción de IL-6 (ELISA). Para ello, CMLp en cultivo fueron estimuladas con LPS, LPS+T, LPS+T-BSA o sus vehículos durante 24 hs. El estímulo con T moduló negativamente los efectos de LPS, confirmando resultados previos. En contraste, T-BSA no moduló negativamente dicho efecto sino que por el contrario aumentó la liberación de IL-6 respecto a LPS ($p<0,05$). En conclusión, se demostró que las CMLp responden a estímulos de T iniciados a nivel de membrana; por otra parte se observó un efecto diferencial en el que T modula la respuesta inflamatoria mientras que T-BSA, actuando solamente a nivel de receptores de membrana, tiene un efecto contrario frente a un estímulo inflamatorio.

236 (651) EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE COMPONENTES DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN NOTCH EN MODELOS MURINOS DE TUMORES HIPOFISARIOS

Sofía Perrone[1]; Elías Gazza[1]; Lautaro Zubeldía Brenner[2]; Nadia Bonadeo[1]; Leticia Baccarini[1]; Damasia Becú Villalobos[2]; Carolina Cristina[1]
Centro de Investigaciones Básicas y Aplicadas CIBA CITNOBA CONICET-UNNOBA[1] IBYME[2]

La vía de señalización Notch participa en procesos de proliferación, apoptosis, angiogénesis y mantenimiento de células madre. Se ha vinculado a diversos tipos de cáncer pero se desconoce su rol en los adenomas hipofisarios. El objetivo del trabajo fue determinar comparativamente la expresión de los receptores Notch y otros componentes de la vía en diferentes modelos de tumores de hipófisis. Evaluamos la expresión de los receptores Notch1-4 por qRT-PCR en la línea celular tumoral de corticotropos murinos AtT20 en comparación con hipófisis de ratón. Los niveles de expresión de Notch3 resultaron menores en AtT20 respecto a la hipófisis normal. Notch4 mostró bajos niveles mientras que Notch1 y 2 fueron los más expresados con valores similares en ambos grupos. De manera interesante, el ligando Jagged1 mostró alta expresión en la línea respecto a las hipófisis murinas ($p<0,05$) y el gen blanco de la vía Hes-5 no mostró diferencias significativas. A su vez los niveles de NOTCH1, 2 y 3, determinados por WesternBlot (WB), resultaron disminuidos en la línea celular. En modelos de prolactinomas de ratas (líneas GH3, MMQ y tumores xenograft de GH3 en ratones nude) comparando con hipófisis normales los perfiles de expresión de los receptores a nivel del ARNm resultaron también menores en las líneas tumorales respecto a la glándula normal. Notch2 fue el más expresado en todos los casos. Por WB se corroboró la menor expresión de NOTCH1 en los modelos tumorales mencionados y en prolactinomas generados con estrógenos. En este último se halló disminuida la expresión de NOTCH1 y 3 ($p=0,053$ y 0,047 N=3,3 tumor vs control) por IHQ respecto a la hipófisis normal predominando la marca de NOTCH3, pero no de NOTCH1, en la proximidad de la zona marginal de la glándula. Estos resultados muestran un patrón diferencial de los receptores Notch en los tumores hipofisarios respecto a la glándula normal contribuyendo a la comprensión del rol de la vía de señalización en el desarrollo de estos adenomas

543 (414) EFECTO MODULADOR DE OCTREOTIDA SOBRE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE SOMATOSTATINA Y TGFβ1 Y LA PROGRESIÓN DEL CICLO DE CÉLULAS TUMORALES ADENOHIPOFISARIAS

Florencia Picech; Liliana Sosa; María Eugenia Sabatino; Carolina Guido; Pablo Prez; Silvina Gutierrez; Ana De Paul; Alicia Torres; Juan Pablo Petiti
INICSA

Los tumores hipofisarios expresan bajos niveles de receptores de señales inhibitorias como los de somatostatina (SST) y TGFβ1. Se ha asociado la baja expresión de los receptores de SST con la resistencia al tratamiento con octreotida (OCT), análogo de SST, demostrando la relevancia de la regulación de la expresión de receptores anti-proliferativos. El objetivo fue analizar el efecto de OCT sobre la expresión de receptores de somatostatina (SSTR2 y SSTR5) y TGFβ1 (TβRI y TβRII), como así también sobre la proliferación en células tumorales adenohipofisarias. Cultivos de células GH3 fueron incubados con OCT (10 y 100nM) a diferentes tiempos (8-48hs).Se analizaron los niveles de ARNm de SSTR2/5,TβRI/II y β-actina por PCR y la expresiónde proteínas reguladoras del ciclo celular (CiclinaD1 y Cdk4) por WB. Se cuantificó la proliferación celular mediante marcación de Ki67 y la progresión del ciclo celular por citometría de flujo.Estadística:Test-t. Se comprobó que las células GH3 expresan los receptores SSTR2 y SSTR5. Además, se observó que el tratamiento con OCT (10 y 100nM) aumentó la expresión de ARNm del receptor SSTR2,

sin cambios en los niveles de SSTR5. Respecto del efecto del análogo de SST sobre la expresión de los receptores de TGFβ se visualizó un incremento en los niveles de TβRI y TβRII luego de la incubación con OCT. La exposición de las células a OCT (100nM) disminuyó significativamente la proliferación celular y la expresión de CiclinaD1 y Cdk4. El análisis de la progresión del ciclo celular mostró un aumento significativo de células en la fase G2/M, de manera dosis y tiempo dependiente. Los resultados demuestran que OCT modula la expresión de receptores de somatostatina y TGFβ, sugiriendo una posible interacción entre ambas señales anti-mitogénicas en células GH3. Además, OCT ejerce efectos anti-proliferativos a través de la disminución de proteínas que regulan el ciclo celular, posiblemente a través de la inducción de arresto celular en la fase G2/M

INFECTOLOGÍA, INFLAMACIÓN E INMUNOLOGÍA 2

237 (181) CARVEDILOL MODIFICA LA VÍA AUTOFÁGICA DE TRYPANOSOMA CRUZI AFECTANDO LA SUPERVIVENCIA PARASITARIA

Cynthia Vanesa Rivero[1]; María Cristina Vanrell[1]; Juan Agustin Cueto[1]; Sara Trosin[2]; Paul Novick[2]; Patricia Silvia Romano[1]
IHEM- UNCUYO[1] Stanford University CA-USA[2]

La Enfermedad de Chagas, causada por el protozoario *T. cruzi* posee una elevada incidencia en Argentina y en toda Latinoamérica. En su etapa crónica, esta patología cursa con inflamación y fibrosis miocárdica con la consecuente disfunción del sistema nervioso autónomo. Estudios recientes muestran que carvedilol, un antagonista de receptores beta adrenérgicos, es efectivo para reducir el daño oxidativo presente en la cardiomiopatía chagásica (Budni et al, 2012). Carvedilol también fue seleccionado como candidato en un tamizaje virtual de compuestos con estructura similar a K777, un inhibidor de cruzipaína, con acción antiproliferativa directa sobre *T. cruzi* (Novick P, datos no publicados), pero, a pesar de esta semejanza estructural, este compuesto no produjo inhibición de cruzipaína *in vitro.* En este trabajo nos propusimos estudiar el mecanismo de acción de carvedilol en *T. cruzi* a nivel celular. Nuestros resultados mostraron que en dosis de 10 uM, este compuesto tiene un significativo efecto inhibitorio de la proliferación de epimastigotes ($p<0.001$) y de amastigotes ($p<0.001$). Estudios morfológicos de los parásitos tratados por microscopía electrónica de transmisión mostraron que los mismos contenían una gran cantidad de vacuolas de doble membrana y vesículas con membranas yuxtapuestas en su interior, similares a compartimientos autofágicos. Este aumento de compartimientos autofágicos fue confirmado por medio de la detección de TcAtg8, una proteína específica de autofagosomas. Llamativamente, el porcentaje de compartimientos acídicos y degradativos detectados con marcadores específicos se redujo considerablemente en presencia de carvedilol, aún en condiciones de inducción de autofagia. Estos resultados indican que carvedilol actúa sobre la vía autofágica parasitaria produciendo una acumulación de compartimientos autofágicos no degradativos que afectan el crecimiento y la vitalidad de *T.cruzi*. Los hallazgos del presente estudio documentan que carvedilol tiene un efecto directo sobre *T. cruzi*, pudiendo ser utilizado en un futuro como un nuevo tratamiento para la Enfermedad de Chagas.

238 (421) EVOLUCIÓN DE CITOQUINAS TH1/TH2EN LA INFECCIÓN CON TRICHINELLA SPIRALIS (TS) EN CINCO LÍNEAS DE RATONES DE LA COLONIA CBI-IGE CON DISTINTA SUSCEPTIBILIDAD AL PARÁSITO

María D Vasconi[12]; Ana V Codina[1]; Paula Indelman[2]; Ricardo Di Masso[13]; Lucila Hinrichsen[13]
Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario[1] Área Parasitología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmaceúticas UNR[2] CIC-UNR Universidad Nacionalde Rosario[3]

Ts es un nematode de complejo ciclo evolutivo en el que se alternan distintas formas morfológicas extra e intracelulares en el mismo huésped. La infección con este parásito genera una variada respuesta inmune. El genotipo del hospedero cumple un rol importante en esta respuesta. El estudio de la carga parasitaria muscular (CPr) en líneas de ratones de la colonia CBi-IGE, 40 días después de la infección con dosis crecientes y comparables de Ts, mostró una muy resistente (CBi/L), una muy susceptible (CBi+) y tres de susceptibilidad intermedia (CBi-, CBi/C y CBi). El objetivo de este trabajo fue analizar el comportamiento de las citoquinas (CQ) IL-2, IL-4, IL-10 e IFN-γ en las 5 líneas durante el curso de la infección con *Ts*. Los animales (n=14 por genotipo, sexo y fecha de sacrificio), infectados con 2 larvas de *Ts* por g de peso, se sacrificaron a los 3, 6, 13 y 30 días post-infección (p-i). Los niveles séricos (pg/ml) de las CQ en las distintas fechas se midieron con un ELISA y se estimó CPr (número larvas L1/g tejido) en lengua a los 30 días p-i. En las fechas analizadas, todos los genotipos produjeron citoquinas del tipo Th1 y Th2, es decir una respuesta mixta. La relación Th1/Th2 medida por el cociente IFN-γ/IL-4 varió en función del tiempo p-i para cada genotipo. Los genotipos susceptibles CBi+, CBi-, CBi y CBi/C mostraron en todas las fechas estudiadas los valores de IFN-γ superiores a los de IL-4. La línea resistente CBi/L mostró esa relación IFN-γ/IL-4 a los 3 días post-infección. A partir del día 6 p-i este genotipo disminuyó IFN-γ a valores similares a los de IL-4. Esto indicaría una inclinación de la respuesta inmune hacia Th2. Las CPr (media±EE) fueron: CBi/L (77±8,5), CBi+ (911±163,5), CBi- (296±75,4), CBi (598±71,5) y CBi/C (662±102,2. La interacción entre la respuesta inmune y los agentes infecciosos es una relación dinámica. La inclinación de la respuesta del hospedero hacia Th2 en la fase aguda ayudó en la resistencia del genotipo CBi/L.

239 (426) VARIACIÓN EN LA RESPUESTA DE CI- TOQUINAS EN DOS LÍNEAS DE RATONES CON DISTINTA SUSCEPTIBILIDAD/RESISTENCIA A TRICHINELLA SPIRALIS (TS) Y EN SUS HÍBRIDOS RECÍPROCOS F1, EN LA REINFECCIÓN CON EL PARÁSITO

Ana V Codina[14]; Paula Indelman[24]; Ricardo Di Masso[13]; María Delia Vasconi[12]; Lucila Hinrichsen[13]
Instituto de Genetica Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario[1] Área Parasitología, Fac. de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario[2] CIC-UNR, Universidad Nacional de Rosario[3] contribuyeron igualmente[4]

El genotipo del hospedero es, sin duda, importante en el control de las infecciones parasitarias y en el establecimiento de una infección. Anteriormente se demostró que las líneas de ratones CBi-IGE difieren en su respuesta al desafío con *Trichinella spiralis (Ts)*, CBi+ es susceptible, CBi/L resistente y sus cruzas recíprocas (F1) intermedias. En la primoinfección estos animales mostraron, independientemente de su genotipo, un patrón combinado de citoquinas séricas Th1/Th2. Con el objetivo de develar los mecanismos inmunológicos involucrados en la defensa de estos hospederos frente a una segunda infección con *Ts*, se estudió el comportamiento de IL-2, IL-4, IFNγ e IL-10 en ratones de los grupos genéticos mencionados. Los animales (n=8 por grupo y fecha de sacrificio) se infectaron (i) con 2 larvas de *Ts* por g de peso y se reinfectaron (ri) con la misma dosis 30 días después. Los niveles séricos (pg/ml) de las IL en las distintas fechas se midieron con un ELISA y se estimó la CPr (número larvas L1/g tejido) en lengua a los 30 días p-ri. La CPr-ri fue alta en CBi+, intermedia en las F1 y baja en CBi/L ($P<0,001$). La diferencia entre CPr-i y CPr-ri sólo fue significativa en machos CBi+ (media±EE, CPr-i=910±163.5, CPr-ri=1685±130.2; $P=0.0012$) y CBi/L (CPr-i=128±15.7, CPr p-ri=241±17.1; $P<0.001$). Estos resultados indican que los grupos genéticos mantienen su carácter de resistencia /susceptibilidad frente a una ri. CBi+ (susceptible) disminuyó IFNγ e IL-4 entre los días 30 p-i y 3 p-ri ($P<0,01$). Por el contrario, CBi/L (resistente) aumentó IFNγ al comienzo de la ri ($P<0,01$); la respuesta de las F1 fue similar a la de CBi/L. Los mecanismos inmunológicos activados después de una infección secundaria por *Ts* no se conocen completamente: en la primoinfección el momento en que se producen las IL y la rapidez con que actúan marcan la respuesta frente al parásito y, muy probablemente, afectan el grado de protección frente a una reinfección.

240 (428) ROL DE LOS RECEPTORES TIROSINA QUINASA TAM EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA HISTIOCITOSIS DE CÉLULAS DE LANGERHANS PEDIÁTRICA

Eugenio Antonio Carrera Silva[1]; Licina Tessone[2]; Diego A Rosso[3]; Andrea E. Errasti[2]
IMEX[1] Instituto de Farmacologia, Facultad de Medicina, UBA[2] Hospital P de Elizalde[3]

La Histiocitosis de células de Langerhans (HCL) es una enfermedad de baja prevalencia pero con significativo impacto sobre la población pediátrica por el elevado riesgo de mortalidad en menores de 2 años. Se caracteriza por lesiones con presencia de células de Langerhans CD1a/CD207, células T, eosinófilos y macrófagos. Pueden afectar un solo órgano, como piel, hueso o pulmón o varios tejidos a la vez con riesgo de falla orgánica. Su etiopatología es desconocida y se especula sería el resultado de un desbalance inflamatorio, transformación neoplásica de precursores tisulares o consecuencia de ambos procesos. Los receptores tirosina quinasa TYRO3, AXL y MERTK (TAM) y sus ligandos Proteína S (PROS1) y GAS6 tienen un rol preponderante en la homeostasis inmune controlando la magnitud de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, la sobreexpresión de estos receptores y sus ligandos son frecuentemente asociados también a proliferación e invasión tumoral. Nuestro objetivo es evaluar el rol de los receptores TAM en la patogénesis de la HCL teniendo en cuenta las dos aristas de la activación de los receptores TAM, como moduladores de la respuesta inmune y por su potencial rol neoplásico. Hemos analizado 4 pacientes HCL activos, 2 de ellos con compromiso multisistémico y, 7 en remisión. Los HCL activos muestran gran incremento de la fracción monocítica ($CD11b^{high}CD11c^{+}$) e interesantemente, TYRO3 y PROS1 se encuentran incrementados en el compartimento mieloide y T de pacientes pediátricos en actividad. Los 2 pacientes con compromiso multisistémico presentaban células circulantes CD1a/CD207. El tratamiento durante 6 semanas con meprednisona y vinblastina se correlacionó positivamente con una reducción de la fracción monocítica y de los niveles de PROS1 y TYRO3. Discernir el rol de la vía de señalización TAM en la inducción y expansión de células HCL patogénicas permitirá contar no solo con nuevas herramientas diagnósticas, sino también proponer a la vía TAM como blancos terapéuticos.

241 (445) LA TOXINA SHIGA TIPO 2 (STX2) PRO- DUCE ABORTO EN RATAS EN ETAPA TEMPRANA DE GESTACIÓN. PROTECCIÓN POR INMUNIZACIÓN CON LA QUIMERA FORMADA POR LA SUBUNIDAD B DE STX2 Y LA LUMAZINA SINTETASA DE BRUCELLA SPP

Flavia Sacerdoti[1]; María Pilar Mejas[2]; Andrea Cecilia Burballa[2]; Julieta Aisemberg[3]; María Marta Amaral[1]; Ana María Franchi[3]; Marina Sandra Palermo[2]; Cristina Ibarra[1]
Lab. Fisiopatogenia, IFIBIO-Houssay, Dpto. Fisiología, Facultad de Medicina, UBA[1] Lab. Patogénesis e Inmunología de procesos infecciosos, IMEX-CONICET, Academia Nacional de Medicina[2] CEFYBO-CONICET, Buenos Aires, Argentina[3]

Las infecciones por *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC) durante el embarazo podrían causar daños maternos y fetales mediados por la toxina Shiga tipo 2 (Stx2). Previamente demostramos que Stx2 produce alteraciones en la unidad úterofeto-placentaria que desencadenan el aborto en ratas en etapa temprana de gestación. En el presente trabajo realizamos una inmunización con la quimera formada por la subunidad B de Stx2 y la lumazina sintetasa de *Brucella spp.* (BLS-Stx2B) con el objetivo de prevenir el aborto inducido por la toxina. Se inyectaron 3 dosis subcutáneas de BLS-Stx2B (200 µg/dosis), una cada 15 días. Los niveles séricos de anticuerpos anti-Stx2B se analizaron por ELISA, y la capacidad neutralizante por ensayo de viabilidad en células Vero. La leche materna obtenida a los 21 días después del parto, se analizó por la técnica de *dot blot*. Las ratas inmunizadas y no inmunizadas, se preñaron y se desafiaron a los 8 días de gestación con 0,5 ng de Stx2/g ó PBS. Se evaluó el peso materno durante la preñez y el número de nacimientos a término. Las crías de madres inmunizadas, amamantadas hasta el destete, se desafiaron con una dosis letal (DL) de Stx2 (100 ng; DL100). La inmunización produjo altos niveles de anticuerpos neutralizantes anti-Stx2. Las madres del grupo inmunizado ganaron peso progresivamente y tuvieron crías de peso normal. El número de crías fue similar al de las ratas controles. Las ratas no inmunizadas y desafiadas con Stx2 perdieron peso y tuvieron 100% de aborto. En la leche de las madres inmunizadas se detectaron anticuerpos anti-Stx2. Todas las crías de las madres inmunizadas, sobrevivieron a la dosis letal de Stx2. Si bien aún no se ha estudiado la posibilidad de que STEC pueda provocar daños en la gestación en humanos, estos resultados indican que podría ser un factor de riesgo para el embarazo y que la inmunidad contra Stx2 sería un factor preventivo de los efectos citotóxicos de la toxina.

242 (598) ROL DE PROTEÍNA S Y LOS RECEPTORES TIROSINA QUINASA TAM EN LA INMUNOREGULACIÓN DE LAS ENFERMEDADES INFLAMATORIAS INTESTINALES

Licina Tessone[1]; Paula Chavero[2]; Alicia Sambuelli[2]; Gabriela De Larraaga[4]; Facundo G. Pelorosso[1]; Arnaldo R. Armesto[1]; E. Antonio Carrera Silva[3]; Andrea E. Errasti[1]
Instituto de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA.[1] Hospital de Gastroenterología B. Udaondo[2] IMEX[3] Hospital de Enfermedades Infecciosas F. Muñiz[4]

Las Enfermedades Inflamatorias Intestinales (EII) son desórdenes recurrentes del tracto gastrointestinal caracterizados por inflamación crónica de la mucosa y daño tisular. La farmacoterapia actual se focaliza en la reducción de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, la EII se asocia frecuentemente a una reparación tisular deficiente o patológica que se manifiesta por la formación de úlceras o fístulas así como de fibrosis o estenosis intestinal.

Los receptores TAM (TYRO3, AXL y MER) pertenecen a una subfamilia de receptores tirosina quinasa recientemente descriptos como potentes moduladores de la respuesta inmune cuando son activados por sus ligandos, Proteína S (PROS1) o GAS6. Interesantemente, PROS1 es expresado luego de la activación de los linfocitos T reduciendo la magnitud de la respuesta inmune innata, y podría ser un mecanismo clave para el control de los procesos inflamatorios crónicos. Por otro lado, se ha observado que la pérdida de AXL y MER está ligado no solo a un incremento de la inflamación sino también a un deterioro en la polarización de macrófagos M2 involucrados en la reparación tisular.

En el presente trabajo observamos que pacientes con Chron activa exhiben niveles plasmáticos de PROS1 significativamente disminuidos con respecto a los voluntarios sanos y pacientes en remisión analizando 54 individuos que incluyen, Colitis ulcerosa, Chron, activos y en remisión y sanos. Por otro lado, se observó un incremento significativo de la fracción CD11b+CD11c+CD64+ en sangre periférica de pacientes con Chron activa. Remarcablemente, células T activadas in vitro también mostraron una expresión significativamente menor con respecto a los voluntarios sanos indicando probablemente una falla en la activación de la vía antiinflamatoria TAM en esta patología.

Identificar los mecanismos que promueven no solo el control de la inflamación sino también la reparación tisular por inducción de macrófagos M2 sería clave para el desarrollo de mejores terapias en EII.

ENDOCRINOLOGÍA 2

243 (58) PAPEL DE LOS MICROARNS 92A Y 93EN LA AUTORREGULACIÓN DE LA TIROIDES

Leonardo Salvarredi[1]; Lisa Thomasz[13]; Luciano Rossich[1]; Mario Pisarev[13]; Alfredo Fusco[2]; Guillermo Juvenal[13]
Comisión Nacional de Energía Atómica[1] IEOS-CNR, Nápoles, Italia[2] CONICET[3]

Introducción: El iodo es utilizado por la tiroides para sintetizar hormonas tiroideas pero cumple además un papel regulatorio a través de la síntesis de iodolípidos como el 2-iodohexadecanal (2-IHDA). Los microARNs (miRs) son una clase de ARNs no codificantes asociados a procesos celulares como la proliferación celular, el desarrollo y la apoptosis. Estudios previos de nuestro laboratorio demuestran que el

microARN let-7f media parte de los efectos inhibitorios del 2-IHDA. Objetivo: Estudiar el papel de otros miRs como intermediarios del efecto del 2-IHDA sobre el crecimiento tiroideo in vitro. Metodología y Resultados: Líneas celulares FRTL-5 fueron tratadas con concentraciones crecientes de 2-IHDA o KI en presencia de TSH durante 24h. Se realizó un análisis de expresión de miRs por medio de un microarray. La incubación de 2-IHDA 10uM resultó en la expresión diferencial de 20 miRs respecto al control ($p<0.05$). A partir de un análisis bioinformático fueron seleccionados los miRs 92a y 93, cuya expresión se vio que estaba disminuida por el 2-IHDA. Esta disminución se validó por qPCR (miR 92a 3.15 veces; miR93; 2,64 veces). Para estudiar la función de estos miRs las células fueron transfectadas con precursores sintéticos (pre-miR) y posteriormente tratadas con concentraciones crecientes del iodolípido (10uM y 30uM). Se observó un incremento de la proliferación celular ($p<0.05$) por el miR 92a y una reversión parcial del efecto inhibitorio del 2-IHDA por el miR 93 ($p<0.05$). Conclusiones: Los miRs 92a y 93 constituyen posibles mediadores del 2-IHDA sobre el crecimiento celular. Estudios complementarios sobre los genes target de estos miRs deben ser realizados para conocer los mecanismos involucrados.

244 (308) ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN IN VITRO DE VARIANTES DEL GEN IGFALS HALLADAS EN NIÑOS CON DEFICIENCIA DE ALS (ALS-D) O CON TALLA BAJA IDIOPÁTICA (TBI)

Lucia Camila Martucci; Paula Alejandra Scaglia; Maríana Liliana Gutiérrez; Liliana Margarita Karabatas; Rodolfo Alberto Rey; Horacio Mario Domené; Sabina Domené; Héctor Guillermo Jasper
CEDIE, CONICET-FEI-División de Endocrinología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires

Introducción:La subunidad ácido-lábil (ALS) forma junto a IGF-I e IGFBP-3 complejos ternarios (CT), prolongando la vida media del IGF-I circulante. Niños con ALS-D, con ambos alelos mutados, presentan reducción severa de los niveles séricos de IGF-I e IGFBP-3 y retraso leve a moderado del crecimiento. Familiares portadores heterocigotos de estas mutaciones, poseen valores de IGFs intermedios entre ALS-D y no portadores, sugiriendo un efecto de dosis génica. Objetivo:Para caracterizar el efecto de variantes del gen *IGFALS* sobre la síntesis, secreción y función de la ALS, se expresaron *in vitro* 13 variantes (p.E35Kfs*87, p.E35Gfs*17, p.L213F, p.N276S, p.R277H, p.P287L, p.A330D, p.L409F, p.A475V, p.R493H, p.C540R, p.S490W y p.R548W) halladas en niños ALS-D y/o TBI (heterocigotos) y se evaluó su capacidad de ser secretadas y de formar CT *in vitro*. Métodos:Las variantes del gen *IGFALS* se obtuvieron por mutagénesis dirigida. Se transfectaron células CHO con *IGFALS* salvaje (WT) o con las variantes. Se detectó ALS en los lisados celulares (LC) y medios condicionados (MC) por Western inmunoblot (WIB) y en MC por ELISA. La formación de CT de las variantes se evaluó incubando MC con ^{125}I-IGF-I e IGFBP-3 y posterior cromatografía de exclusión molecular. Resultados:WIB muestran que: a) p.R277H, p.P287L, p.A330D, p.A475V, p.R493H y p.R548W se detectan en LC y MC; b) p.E35Kfs*87, p.E35Gfs*17, p.N276S, p.L409F, p.S490W y p.C540R no se observan en LC ni MC y c) p.L213F se visualiza sólo en LC. Al determinar ALS por ELISA en CM los niveles de p.A330D secretada fueron significativamente menores que WT-ALS ($p<0.05$). La capacidad de formar CT *in vitro* de p.P287L, p.A330D, p.A475V y p.R548W fue similar a la de WT-ALS. Conclusiones:Todas las variantes presentes en ALS-D afectaron la síntesis y/o secreción de ALS. Las variantes presentes en TBI en heterocigosis presentaron síntesis normal, reducida o ausente. Las variantes secretadas mantuvieron su capacidad de formar CT *in vitro*.

245 (251) VIAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS EN EL EFECTO ANTIAPOPTÓTICO DE LA HUMANINA EN CÉLULAS PITUITARIAS

María Florencia Gottardo; Mariela A. Moreno Ayala; Sandra Zárate; Jimena Ferraris; Gabriela Jaita; Maríanela Candolfi; Adriana Seilicovich
INBIOMED (UBA-CONICET)

La Humanina (HN) es un péptido aislado originalmente de un ADNc de neuronas de pacientes con enfermedad de Alzheimer con acción citoprotectora en varios tipos celulares. La Ratina (HNr), péptido homólogo de HN en rata, también tiene una acción citoprotectora. Previamente, hemos demostrado que la HNr se expresa en células adenohipofisarias normales y tumorales, en las cuales la HN inhibe la apoptosis inducida por TNF-α. Nuestro objetivo fue identificar las vías de señalización que median el efecto antiapoptótico de la HN en la linea tumoral de somatolactotropos GH3. La expresión de HNr (por citometría de flujo) es mayor que en células adenohipofisarias no tumorales ($p<0.05$, χ^2). Con el objetivo de estudiar los mecanismos involucrados en la acción de HN, células GH3 fueron incubadas con HN y TNF-α en presencia de inhibidores de las vías de señalización de STAT3, AKT, MEK, JNK y p38 y la apoptosis fue determinada por TUNEL. La inhibición de STAT3 con JSI-124 bloqueó el efecto antiapoptótico de HN (TNF-α: 9.5%; TNF-α-HN: 4.3%; TNF-α-JSI-124: 10.2%; TNF-α-HN-JSI-124: 8.7, $p< 0.05$, χ^2). Los inhibidores de las otras vías no modificaron la acción de HN. Además, analizamos el rol del NFkB en el efecto de la HN utilizando un inhibidor de esta vía, BAY 11-7082 (BAY). BAY inhibió el efecto antiapoptótico de la HN en presencia de TNF-α (TNF-α: 8.3%; TNF-α-HN: 3.6%; TNF-α-BAY: 8.1%; TNF-α-HN-BAY:7.9, $p< 0.05$, χ^2). Además, la HN (por WB) disminuyó la expresión de la proteína proapoptótica Bax y aumentó la de la antiapoptótica Bcl2. Nuestros resultados sugieren que tanto STAT3 como NFkB así como las proteínas de la familia Bcl2 median la acción antiapoptótica de la HN. El mecanismo de acción de la HN en células tumorales adenohipofisarias sería complejo y estarían involucradas múltiples vías. Estos resultados puede contribuir al diseño de una terapia utilizando la HN como un potencial blanco terapéutico para el tratamiento alternativo de tumores hipofisarios.

246 (425) CÉLULAS STEM/PROGENITORAS AISLADAS DE HIPÓFISIS ADULTAS SON CAPACES DE FORMAR ESFEROIDES Y DIFERENCIARSE A DISTINTOS LINAJES

Alicia Vaca; Liliana Sosa; Carolina Guido; Jp. Petiti; Alicia Torres
Centro de Microscopía Electrónica, Fac. de Cs. Médicas, UNC, INICSA-Conicet

La presencia de células stem/progenitoras (CS/P) ha sido previamente demostrada en la zona marginal de hipófisis de ratas adultas. Para completar la caracterización morfológica y funcional de las CS/P nos propusimos obtener estructuras esféricas, denominadas “pituesferas”, a partir de cultivos hipofisarios de ratas adultas. Suspensiones celulares de hipófisis de rata hembras Wistar de 3 meses de edad fueron cultivadas por 48h en medio adecuado para favorecer la adherencia de células epiteliales. Luego, el sobrenadante fue cultivado en placas no adherentes con medio suplementado con B27, para mantener el estado indiferenciado de CS/P y con FGF-2 y EGF. Se realizaron 5 pasajes para enriquecer el cultivo con esferoides y disminuir la formación de agregados celulares. La expresión de marcadores de fenotipo stem: GFRa2, Oct-4 y Sox2 y progenitor: Sox9 fue determinada por inmunofluorescencia en cortes de ultracriomicrótomo. Además, se realizaron ensayos de autorenovación y diferenciación de pituesferas en medios específicos para distintos linajes. Una población heterogénea de esferoides en tamaño y celularidad fue observada por microscopía de contraste de fase. A nivel ultraestructural, se identificaron células con escaso citoplasma y núcleos de gran tamaño en zona central de la pituesfera, mientras que algunas con morfología compatible a células mesenquimales se distribuyeron en la periferia. Las células de los esferoides fueron positivas para GFRa2, Oct-4, Sox2 y Sox9 y negativas para PRL. El ensayo de autorenovación reveló que una única célula es capaz de originar un esferoide completo. Las pituesferas, mantenidas en medios específicos, se diferenciaron a células que expresaron PRL y GH y fenotipos similares a neuronas Tuj-1+ y GFAP+. Estos resultados demuestran la capacidad de las CS/P de formar esferoides en cultivo y de diferenciarse a distintos linajes celulares, lo cual indica el grado de pluripotencialidad de esta población de células hipofisaria

247 (437) EFECTOS IN VIVO DEL ALENDRONATO SOBRE EL HUESO DIABÉTICO: ESTUDIO DE DIFERENCIACIÓN DE CPMO E HISTOMORFOMETRÍA EN UN MODELO MURINO DE DIABETES CON DÉFICIT PARCIAL DE INSULINA

Sara Chuguransky; Antonio Mccarthy; Ana Mara Cortizo
Univ. Nac. de La Plata Fac. de Cs. Exactas

La Diabetes mellitus se asocia con alteraciones óseas. El Alendronato(Ale) interviene en la osteogénesis, condrogénesis y adipogénesis. Se estudió el efecto del tratamiento con Ale sobre la microarquitectura ósea y la capacidad osteogénica, adipogénica y condrogénica de CPMO que se obtuvieron por lavado del canal diafisario femoral de ratas Wistar, sometidas a un tratamiento oral con Ale (1mg/kg/día) en el agua de bebida durante 15 días. Se les indujo Diabetes por inyecciones de estreptozotocina (60mg/kg/día) y nicotinamida (75mg/kg/día). Los grupos experimentales fueron: Control (C), Control+Ale (CA), Diabéticas (D) y Diabéticas+Ale (DA). Las CPMO se incubaron 7-21 días en medios de diferenciación específico. Se evaluó la diferenciación osteoblástica por FAL,Col-1 y Min. La diferenciación condrogénica se evaluó por producción de GAG y la adipogénica por acumulación intracelular de triglicéridos. Para evaluar los efectos en la microarquitectura y celularidad ósea se disecaron fémures de ratas de los 4 grupos. Los cortes histológicos se tiñieron con Hematoxilina-eosina y TRAP. Las CPMO de ratas D mostraron una menor capacidad osteogénica y condrogénica que las del grupo C,observándose una disminución significativa($p<0,05$ de C) de Col-1 (51%),FAL (10%),Min (20%) y GAG (40%);en tanto que las CPMO de DA mostraron una prevención total o parcial de estos efectos (Col-1 y FAL~C, Min 40% y GAG 82%).En la diferenciación adipogénica se observó un aumento en la producción de triglicéridos intracelulares en el grupo D (166%) y una prevención de este efecto en el grupo DA (80%).El área trabecular relativa disminuyó en el grupo D (78%),efecto que fue prevenido por el tratamiento con Ale(DA). La densidad de osteocitos en los grupos D y DA no mostró variaciones respecto a C,aunque sí hubo un aumento en el grupo CA (170%).El área TRAP aumentó en el grupo D (171%) mientras que en los grupos CA y DA disminuyó respecto de C. En conclusión el Ale previno los efectos deletéreos inducidos por la Diabetes.

248 (501) LA OVARIECTOMÍA (OVX) INDUCE PROFUNDAS ALTERACIONES EN EL SISTEMA TGF-β1 HIPOFISARIO PREDISPONIENDO A LA GLÁNDULA A UN FENOTIPO PROLIFERATIVO

María Andrea Camilletti; Alejandra Abeledo; Erika Faraoni; María Cecilia Bottino; Graciela Diaz-Torga
IBYME

Previamente demostramos que un tratamiento crónico con estrógenos (pellet sc de 20mg de dietilestilbestrol, 4 sem) en ratas hembra adultas Sprague Dawley, genera prolactinomas de mayor tamaño si las hembras son previamente OVX. En el presente trabajo estudiamos las alteraciones hipofisarias que provoca la OVX sobre uno de los principales sistemas inhibitorios de la función del lactotropo: el sistema TGFβ1. Observamos que la OVX provoca una drástica disminución de la actividad biológica de TGFβ1 en la hipófisis (pSMAD2/3 medido por western, genes blanco medidos por qRT-PCR), hecho que favorecería al desarrollo del prolactinoma. Sin embargo, llamativamente, no encontramos alterados los niveles de TGFβ1 activo y total (ELISA). Por el contrario, al evaluar la expresión de otros componentes del sistema por qRT-PCR observamos que tanto sus receptores (TßRII, ALK1, ALK5), sus correceptores (endoglina, LRG1) y hasta la misma citoquina (mRNA) se encontraban aumentados en hipófisis OVX. ¿Por qué el aumento en la expresión de todo el sistema TGFβ1 no se ve reflejado en un aumento de la actividad biológica de la citoquina? Decorina y biglican (pequeños proteoglicanos) son capaces de secuestrar TGFβ1 dentro de la matriz extracelular, impidiendo así su efecto. Evaluamos la expresión de estos compuestos y observamos un significativo aumento de Decorina y Biglican en hipófisis de hembras OVX. Corroboramos que ambos proteoglicanos son regulados NEGATIVAMENTE por estradiol (valerato de E2, 0,2mg/kg, sc), en tratamientos agudos (1, 2 y 24hs) y crónicos (DES, 4 semanas). Concluimos que la OVX provoca una drástica disminución en la actividad biológica de TGFβ1 en hipófisis, favoreciendo el desarrollo de un prolactinoma de mayor tamaño (respecto a hembras enteras). Esto NO se debería a una baja expresión del sistema TGFβ1 local, sino principalmente al secuestro de la citoquina en la matriz extracelular por Decorina y Biglican en hipófisis de hembras OVX.

422 (436) EFECTO REGULATORIO DEL ESTRADIOL SOBRE LA PALMITOILACIÓN DEL REα Y LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS NORMALES Y TUMORALES

Liliana Del Valle Sosa[1]; Alicia M. Vaca[1]; Florencia Picech[1]; Carolina B. Guido[1]; Juan Pablo Nicola[2]; Juan Pablo Petiti[1]; Ana De Paul[1]; Silvina Gutierrez[1]; Alicia I. Torres[1]
Centro de Microscopia Electrica-INICSA-CONICET[1] CIBICI-CONICET, Fac de Ciencias Químicas, Univ. Nac. de Córdoba[2]

En trabajos previos hemos demostrado la palmitoilación del REα en células adenohipofisarias normales y tumorales. La regulación de esta modificación postraduccional del REα mediada por estradiol (E2) podría modificar la movilización del pool de RE intracelulares a la membrana plasmática. El objetivo fue determinar si E2 es capaz de modular la expresión de las palmitoilasas DHHC-7 y DHHC-21 y la actividad proliferativa de células adenohipofisarias normales y tumorales. Cultivos primarios adenohipofisarios de ratas Wistar hembra y de la línea GH3 fueron tratados con E2 (10nM) por 30 min. La expresión de REα de membrana (REαm) fue evaluada por biotinilación de proteínas de membrana y la asociación del REαm y caveolina-1(cav-1) por inmunoprecipitación. La proliferación celular fue analizada luego de 24h de incorporación de BrdU por inmunocitoquímica. La expresión del REα, cav-1 y ERK total y fosforilada fue analizada por WB. La participación de las palmitoilasas fue evaluada utilizando el inhibidor, 2bromo palmitato (2BP, 10 μM). Los niveles de ARNm de DHHC-7 y DHHC-21 se determinaron por qPCR luego de 3, 6, 9 h de estímulo con E2. Estadística: Test-t. La inhibición de la palmitoilación del REα indujo pérdida de su localización en membrana e inhibición de la asociación de REα y cav-1 en cultivos primarios y GH3. En ambos tipos celulares, los niveles de ARNm de DHHC-7 y DHHC-21 disminuyeron luego de 3h de incubación con E2, alcanzando niveles similares al control luego de 6h de estímulo. En cultivos primarios, E2 no produjo cambios en la actividad mitogénica, observándose la inhibición de la fosforilación de ERK1/2 con 2BP. Sin embargo, E2 aumentó la proliferación de células GH3 en forma coincidente con la fosforilación de ERK1/2, efectos que fueron inhibidos por 2BP. En resumen, el E2 podría modular las palmitoilasas DHHC-7 y DHHC-21 regulando así, la expresión del REα de membrana y finalmente la proliferación de células adenohipofisarias normales y tumorales

ONCOLOGÍA 4

249 (8) ESTUDIO DE CRECIMIENTO DE CÉLULASDE CÁNCER DE VEJIGA SILENCIADAS PARA INOS MEDIANTE ENSAYOS DE BIOLUMINISCENCIA IN VIVO

Denise Belgorosky[1]; Julie Girouard[2]; Jovane Hamelin-Morissete[2]; Carlos Reyes-Moreno[2]; Ana María Eijan[1]
Inst. de Oncologia Dr. Angel Roffo[1] Universidad de Quebec en Trois Rivieres (UQTR)[2]

Introducción: La expresión de iNOS, enzima productora de altos niveles de óxido nítrico (NO), en los tumores de vejiga humano es un factor de mal pronóstico, asociado a invasión y recurrencias tumorales. La utilización de inhibidores farmacológicos de la producción de NO reducen la proliferación y el crecimiento in vivo de células de CaV murinas, indicando que el NO es un factor de sobrevida para estos tumores. Para establecer la importancia de iNOS en CaV planteamos como objetivo silenciar genéticamente iNOS y estudiar el crecimiento tumoral mediante ensayos de bioluminiscencia in vivo. Metodología: ***Invitro:*** Las células MB49-I, expresando consti-

tutivamente la enzima luciferasa se silenciaron para iNOS, utilizando un shRNA (MB49-I-shiNOS-Luc). Como control se generó la línea MB49-I-scr-Luc. Se evalúo el silenciamiento por western blot y actividad enzimática a través del reactivo de Griess. ***In vivo:*** Ratones C57BL/6J fueron inoculados en subcutáneo (2,5x10^{5}cel/ratón) o en la vejiga (2,5x10^{4}cel/ratón) para analizar: a) crecimiento tumoral y b) diseminación metastasica usando un equipo Sistema Xenogen IVIS Spectrum, que permite visualización y cuantificación de células dentro de un organismo vivo a tiempo real. Resultados: La línea MB49-I-shiNOS-Luc, presentó un silenciamiento mayor al 50%, observado tanto en la expresión de la enzima, como en su actividad ($p<0.01$ vs. MB49-I-scr-Luc). Dicho silenciamiento inhibió el crecimiento de tumores subcutáneos y ortotópicos ($p<0.05$; $p<0.01$ respectivamente vs. MB49-I-scr-Luc), cuantificado como niveles de luminiscencia. No fue posible identificar presencia de metástasis. Conclusión: Silenciando el gen que codifica para iNOS, confirmamos los resultados previamente reportados utilizando inhibidores farmacológicos, donde el NO es un factor de sobrevida para los tumores MB49-I. Las células generadas, son una herramienta útil para evaluar el crecimiento en tiempo real, y para posibles estudios preclínicos.

250 (47) ROL DE LA METALOPROTEINASA ASOCIADA A MEMBRANA DE TIPO I (MT1-MMP) DURANTE LA TRANSICIÓN DE TUMORES DE UN ESTADIO IN SITU A UNO INVASOR EN EL CARCINOMA DE MAMA

Catalina Lodillinsky[12]; Elvira Infante[2]; Alan Guichard[2]; Laetitia Fuhrmann[2]; Marie Irondelle[2]; Anne Vincent-Salomon[2]; Ana María Eijan[1]; Philippe Chavrier[2]
Inst de Oncología AH Roffo[1] Membrane and Cytoskeleton Dynamics, Institut Curie, Research Center, 75005 Paris, France[2]

Comprender el proceso de progresión tumoral requiere un análisis tanto a nivel molecular, como celular. En particular, la transición del carcinoma ductal *in situ* a un estadio invasor es un proceso aun no conocido. MT1-MMP es esencial para la remodelación del colágeno intersticial durante la invasión. La función de MT1-MMP durante la transición de tumores *in situ* a invasor fue investigada usando un modelo xerográfico donde células tumorales humanas (MCF10.DCIS.com) son inyectadas dentro del conducto galactóforico mamario de ratones SCID. Estas células, MT1-MMP positivas, generan luego de 5 semanas tumores *in situ*, los cuales progresan espontáneamente a invasores luego de 10 semanas, pasando por un estadio microinfiltrante. La expresión de MT1-MMP es homogénea en los tumores *in situ* y se incrementa en la región microinvasiva. En el estadio invasor, el frente de invasión también muestra una sobreexpresión de la enzima, en paralelo con un incremento del deposito de colágeno. Para estudiar la funcionalidad de MT1-MMP en el proceso de transición, células silenciadas para esta proteína fueron inyectadas usando la misma técnica. Hemos observado que los tumores *in situ* se generan normalmente, pero que solo un 20% de ellos desarrolla tumores invasores (100% en el grupo CRL) (X^2 test $p=0,001$). El hecho de que el aumento en la expresión de MT1-MMP se de en paralelo con una fuerte deposición de colágeno, sugiere que la activación estromal, puede modular la expresión de esta enzima. Para evaluar esta hipótesis, y basándonos en estudios previos que describen al tratamiento con ribosa como tratamiento modulador de la activación estromal, se generaron tumores en el "fat-pad" luego de la inyección de células tumorales de mama humano, MDA-MB-231. Los ratones tratados o no con ribosa intraperitoneal fueron analizados por microscopia intravital, utilizando la técnica SHG (Second Harmonic Generation) especifica para la visualización de colágeno in vivo. Nuestros resultados indican que tanto el nivel de expresión de MT1-MMP como la cantidad de colágeno están incrementado en los tumores que recibieron ribosa (Mann Whitney test $p<0,05$) indicando que existe una asociación entre la expresión de MT1-MMP y la remodelación estromal. En conjunto, nuestros resultados demuestran que MT1-MMP es un factor clave para la progresión de tumores de mama.

251 (125) ISOFORMAS DEL FACTOR DE CRECI- MIENTO DE FIBROBLASTOS 2 (FGF2) Y RESISTENCIA HORMONAL EN MODELOS DE CÁNCER DE MAMA

Ana Sahores; Cynthia Fuentes; María May; Marina Riggio; Claudia Lanari; Caroline A. Lamb
IBYME

El 75% de los carcinomas mamarios expresan receptores de estrógenos y progesterona (PR) y son susceptibles a una terapia endocrina. Sin embargo, algunos pacientes no responden o desarrollan resistencia a la terapia hormonal. La vía del FGF2/FGFR se encuentra desregulada en diversos tipos de cáncer. En humanos, existen cinco isoformas de FGF2 con distinto peso molecular: la isoforma 18 kDa (LMW-FGF2) y las de alto peso (HMW-FGF2) de 22, 22.5, 24 y 34 kDa. En nuestro laboratorio, usando modelos de carcinomas mamarios murinos y humanos, demostramos que las variantes tumorales resistentes a la terapia con el antiprogestágeno mifepristona (MFP) expresan una mayor proporción de isoforma B que A del PR en comparación con los tumores sensibles, que expresan la relación inversa. Recientemente, observamos que variantes resistentes del modelo murino expresan mayores niveles de HMW-FGF2. Nuestro objetivo es estudiar el rol de las isoformas de FGF2 en la resistencia endocrina en modelos de cáncer de mama humano. Utilizamos las líneas celulares IBH-6-PRA y T47D-YA, con alta expresión de PRA y sensibles a MFP, y la línea T47D-YB, con alta expresión de PRB y resistente a MFP. Observamos que las T47D-YB expresan mayores niveles de HMW-FGF2 que las T47D-YA y que 100 ng/ml de LMW-FGF2 indujo la proliferación celular sólo en las T47D-YA ($p<0,001$). Por recuento celular observamos que la sobreexpresión de la isoforma 22.5 kDa en las variantes sensibles indujo un aumento en la tasa de proliferación celular ($p<0,001$) y resistencia al tratamiento con MFP en comparación con las líneas control (IBH-6-PRA-Vac y T47D-YA-Vac). La resistencia a MFP se mantuvo aún en ensayos *in vivo* (MFP *pellet* 6 mg). Estos resultados serían la primera evidencia de una asociación entre la expresión de HMW-FGF2 y la resistencia hormonal en modelos de cáncer de mama. Los niveles de HMW-FGF2 y PRB podrían servir como marcadores predictivos de aquellos pacientes que no se beneficiarían de la terapia hormonal.

252 (145) CADHERINA EPITELIAL EN EL PROCESO DE DISEMINACIÓN DEL CÁNCER DE OVARIO

Marina Rosso[1]; Blanca Majem[2]; María Florencia Abascal[1]; Lara Lapyckyj[1]; Marta Llaurado[2]; María Laura Matos[1]; Laura Devis[2]; María Jose Besso[1]; Antonio Gil Moreno[2]; Jaume Reventos[2]; Marina Rigau[2];Monica Vazquez-Levin[1]
IBYME[1] Vall Hebron Research Institute University Hospital[2]

Introducción: El cáncer de ovario (CO) es la 5ta causa de muerte por cáncer en mujeres en el mundo. Las células de CO pueden liberarse del tumor primario, agregarse/sobrevivir en suspensión (ascitis) e implantarse dentro de la cavidad peritoneal dando metástasis. Si bien hay reportes sobre alteraciones en cadherina epitelial (cadE) en CO, los resultados disponibles sobre su impacto en la diseminación de esta enfermedad no son concluyentes. Objetivo: Caracterizar la expresión de cadE y moléculas relacionadas en modelos/muestras de CO. Materiales/Métodos: Evaluar 1) expresión de cadE en un microarreglo de 98 tejidos de CO; 2) mecanismos regulatorios de la expresión de cadE (mutaciones, represores transcripcionales) en CO por bioinformática; 3) expresión de cadE, cadN y marcadores de la transición epitelio-mesenquimal (TEM) en las líneas celulares de CO TOV112, SKOV3, OAW42 y OV90 creciendo en monocapa y en suspensión; 4) características funcionales de las 4 líneas creciendo en monocapa (migración) y en suspensión (agregación, muerte, adhesión e invasión); 5) expresión de cadE, cadN y marcadores de la TEM en muestras humanas de CO. Resultados: Se observó 1) disminución de cadE con la progresión del CO (alta expresión en estadíos I-II (no invasivos) y baja en III-IV (invasivos)); 2) 4 mutaciones para cadE en 988 tumores de CO (COSMIC) y sobre-expresión de represores de cadE en tumores comparado con tejido normal (Babelomics); 3) fenotipos epitelial (OV90), intermedio (OAW42 y SKOV3) y mesenquimal (TOV112) en función de los niveles de cadE, cadN y marcadores de la TEM; 4) mayor migración para TOV112 y SKOV3 en monocapa, y menor muerte,

mayor adhesión a matrices extracelulares y mayor invasión en matrigel para los agregados de estas líneas; 5) aumento de expresión de cadE y disminución de cadN en cultivos primarios de ascitis comparado con los de tumor primario de CO. Conclusión: Se identificó una asociación entre la agresividad de las células de CO y un perfil molecular mesenquimal, que depende de los niveles de expresión de cadE y cadN.

253 (196) REGULACION DE ZEB1 POR IGF1R EN LA TRANSICIÓN EPITELIO MESENQUIMATOSA DE CELULAS NMUMG DE EPITELIO MAMARIO MURINO

María Candelaria Llorens[12]; María Victoria Vaglienti[2]; Ana María Cabanillas[12]
CIBICI[1] Fac. de Cs. QuímicaS, UNIV. NAC. Córdoba[2]

ZEB1 (Zinc Finger E-box Binding Homeobox) es un factor de transcripción de la transición epitelio mesenquimatosa (EMT). Previamente identificamos un fragmento aminoterminal de ZEB1 capaz de inducir EMT por si solo cuando es sobreexpresado en células epiteliales normales de mama de ratón NMuMG (NMuMG-NZEB1). En el presente trabajo nuestro Objetivo es evaluar las vías de señalización capaces de regular la función de NZEB1 en el EMT. Células NMuMG-NZEB1 se trataron con activadores e inhibidores específicos de vías por 48hs: DMSO, IGF1 10nM, EGF 50nM/mL, TGFb 5ng/mL, PMA 10ng/ml IONO 10ng/ml, Calphostin C 50 nM, LY294002 20 µM, PD98059 20 µM, UO126 20 µM, UO124 20 µM, NVP-AEW541 5µM y LiCl 50 mM. Los resultados de WB revelaron que ninguno de los tratamientos revierten la disminuida expresión de E-Cadherina inducida por NZEB1 lo que sugiere que el estado de fosforilación de este fragmento no es crítico para el rol de ZEB1 sobre EMT. Sin embargo, sólo NVP-AEW541(inhibidor de IGF1R) disminuyó significativamente la expresión de N-ZEB1 ($P<0.05$). Esta última condición (NVP 5µM por 48 hs) se ensayo sobre otros marcadores de EMT como expresión y distribución de F-actina (Microscopía confocal e IF) y capacidad migratoria (Wound Healing) e invasiva (invasión en Matrigel) de las NMUMG-NZEB1. Los resultados revelaron que estas células tratadas con NVP, presentan tendencia a reorganizar los filamentos de actina de manera cortical, tipo epitelial-like, con una marcada disminución en la migración e invasión respecto del control ($P<0.001$). A fin de evaluar la participación del proteasoma en el efecto de NVP, las NMuMG-NZEB1 fueron tratadas con NVP-AEW541 5µM y/o MG132 5µM durante 48 hs. La presencia de MG132 revirtió el efecto de NVP con aumento de la expresión de N-ZEB1. Los resultados sugieren que la vía de IGF1R podría ser capaz de regular la expresión de NZEB1 y consecuentemente el proceso de EMT, mediante la regulación de la estabilidad proteica de dicho factor via proteasoma.

254 (250) BLOQUEO TERAPÉUTICO DE FOXP3EN CARCINOMAS MAMARIOS EXPERIMENTALES

Mariela Alejandra Moreno Ayala[1]; María Florencia Gottardo[1]; Antonela Asad[1];Maríana Puntel[2]; María Graciela Castro[3]; Elisa Bal De Kier Joffé[4]; Noelia Casares[5]; Juan José Lasarte[5]; Adriana Seilicovich[1]; Maríanela Candolfi[1]
INBIOMED (UBA-CONICET)[1] Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVYA, INTA-Castelar)[2] University of Michigan School of Medicine, Ann Arbor, MI, USA[3] Instituto de Oncología Angel H. Roffo[4] Universidad de Pamplona, Navarra, España[5]

Las células T regulatorias (Tregs) han sido involucradas en la baja eficacia de vacunas en pacientes con cáncer. De hecho, cuando inyectamos vacunas antitumorales de células dendríticas estimuladas con CpG a ratones portadores de carcinomas mamarios LM3 observamos una expansión rápida de Tregs ($CD4^+/Foxp3^+$) en bazo (día 0=2.4%±0.3; día 3=3.3%±0.2; $p<0,05$) y tumor (d0=4±2x10^4; d3=16±2x10^{4}Tregs/tumor, $p<0.05$). Nuestro objetivo fue evaluar el efecto del bloqueo de Foxp3 en este modelo. La administración ip de P60, un péptido penetrante de membranas que inhibe la translocación nuclear de Foxp3 (Casares et al 2010), redujo la expansión de Tregs esplénicas [Vac+péptido control (PC)=5.8±0.8x10^6;Vac+P60=2.3±0.7x10^{6}Tregs/bazo, $p<0.05$] e intratumorales (Vac+PC=18±5x10^4;Vac+P60=4±1x10^{4}Treg/tumor, $p<0.05$) inducida por la vacuna. Dado que ha sido reportado que Foxp3 podría expresarse en células tumorales, evaluamos su presencia y función en células LM3 y 4T1. Detectamos Foxp3 sólo en células LM3. Asimismo, P60 inhibió la incorporación de BrDU en células LM3 (PC=2.1±0.03 UA; P60=1.7±0.14, $p<0.05$), y redujo su viabilidad en un 20% (MTT, $p<0.05$), sugiriendo que Foxp3 favorece la supervivencia de estas células. Luego, desarrollamos un plásmido que codifica para P60 y un plásmido control. Transfectamos células 4T1 y utilizamos su medio condicionado (MC) o P60 para incubar células LM3. Luego de 24 hs medimos IL-10, que ha sido involucrada en la patogenia del cáncer de mama. Tanto el MC como P60 redujeron la capacidad de células LM3 de secretar IL-10 (C=433±70;MC=190±14pg/ml; $p<0.05$; PC=416±27; P60=83±32pg/ml; $p<0.05$). Nuestros resultados sugieren que el bloqueo de Foxp3 podría tener un beneficio dual al utilizarse en combinación con vacunas, tanto por inhibición de Tregs, como ejerciendo una acción directa sobre la célula tumoral. Además, dado que pudimos bloquear Foxp3 utilizando un plásmido, es posible construir vectores de terapia génica para producir P60 localmente.

255 (269) ASOCIACIÓN ENTRE HEMO OXIGENASA1 Y EL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES EN CÁNCER DE PRÓSTATA

Daiana Beatriz Leonardi; Nicolas Anselmino; Alejandra Veronica Paez; Federico Schuster; Geraldine Gueron; Javier Hernan Cotignola; Elba Susana Vazquez
Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA/IQUIBICEN- CONICET

En pacientes con cáncer de próstata (CaP) refractario a hormonas se comprobó que la terapia con glucocorticoides (GC) disminuye tanto la producción de andrógenos como la inflamación. Sin embargo, recientemente se ha reportado que el receptor de glucocorticoides (GR) puede sustituir al receptor de andrógenos (AR) y activar un subgrupo similar aunque distinguible de genes. El objetivo del presente trabajo es estudiar la función de GR en distintas líneas celulares de CaP al sobre-expresar la proteína antioxidante y anti-inflamatoria hemo oxigenasa 1 (HO-1). Inicialmente se analizó el efecto del GC sintético dexametasona (Dex) sobre la viabilidad de las líneas celulares de próstata PC3 (AR-/GR+) y C4-2B (AR+/GR+). Para estudiar la actividad transcripcional de GR las células fueron transfectadas con un plásmido que tiene elementos de respuesta a GC río arriba del gen de la luciferasa (MMTV-luc). Se realizaron tratamientos con hemina (inductor de HO-1, 80µM, 24h), Dex (10^{-8} M, 6h) o ambas drogas. El tratamiento combinado redujo significativamente ($p<0,05$) la actividad de luciferasa respecto al tratamiento con Dex. Por microscopia confocal se observó menor translocación nuclear de GR en células tratadas con hemina+Dex *vs* Dex. Además, por co-inmunoprecipitación se demostró la interacción física entre GR y HO-1 tanto en núcleo como en citoplasma. Dado que el CaP presenta generalmente metástasis osteoblásticas, se estudió la expresión de GR en células MC3T3 (preosteoblastos murinos) en las condiciones ensayadas en las líneas de próstata, obteniéndose el mismo efecto del tratamiento combinado respecto a Dex. Finalmente, se midió por Western blot y RT-qPCR la expresión de GR al co-cultivar PC3 con precursores de osteoblastos y osteoclastos. En conclusión, nuestros resultados demuestran la asociación entre HO-1 y GR, siendo el receptor modulado por HO-1 tanto en células de CaP como en las líneas óseas.

256 (324) LA FOTOACTIVACIÓN DE TETRAACE- TATO DE RIBOFLAVINA GENERA ESPECIES REACTIVAS INDUCIENDO APOPTOSIS EN CÉLULAS TUMORALES CON PARTICIPACIÓN DE LA VÍA MAPK-ERK1/2

Andrea Virginia Juarez[1]; Liliana Del Valle Sosa[1]; Ana Paula Costa[2]; Rodrigo Bainy Leal[2]; Alicia Torres[1]; Patricia Pons[1]
Centro de Microscopía Electrónica, INICSA-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba[1] Dpto. de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina[2]

La terapia fotodinámica (TFD) es un tratamiento contra el cáncer cutáneo no melanoma, basado en la combinación de un fotosensibilizador (FS), oxígeno y luz. Sin embargo, el desarrollo de efectivos FS es un tema de gran interés en la actualidad. Nos propusimos estudiar la efectividad de tetraacetato de riboflavina (RTA) en TFD en células humanas de carcinoma escamoso (SCC-13), evaluando el efecto de especies reactivas (ER) generadas por su fotoactivación y las vías de señalización involucradas en el mecanismo de muerte celular. Células SCC-13 fueron incubadas con RTA (50μM/3h) e irradiadas (9J/cm^2, 446nm). Para analizar el mecanismo de muerte desencadenado por TFD se determinaron diferentes parámetros tales como: expresión de diferentes proteínas por inmunofluorescencia y WB; generación de ER con 2,7-dihidrodicloro fluoresceína por citometría de flujo; análisis de la respiración mitocondrial en oxígrafo de alta resolución; contenido de glutatión reducido por tioles totales no proteicos (NPSH); producción de $\cdot O_2^-$ con dihidroetidio y potencial de membrana mitocondrial con JC-1 por espectrofluorometría. Estadística: ANOVA de dos vías. Luego de la TFD-RTA, se observó expresión de citocromo c en citoplasma, disminución en la expresión de pro-caspasa 3 y Bcl2 y aumento de ERK1/2 fosforilada. Sin embargo, la terapia no indujo cambios de expresión de la proteína pro-apoptótica Bax ni de p-p38. La TFD-RTA generó altos niveles de ER, aumento de $\cdot O_2^-$, sin variación en el potencial de membrana mitocondrial. Además, se detectó un incremento en los niveles de NPSH, lo que podría ser un mecanismo de defensa antioxidante generado por las células para contrarrestar el daño oxidativo. En conjunto, estos resultados permiten inferir que la generación de ER por la aplicación de RTA-TFD, serían activadores de la vía intrínseca de muerte apoptótica con participación de MAPK/ERK1/2 en células SCC-13, indicando que el RTA sería un efectivo fotosensibilizador en la aplicación de TFD.

NEUROCIENCIAS 4

257 (16) EFECTO TERAPÉUTICO DE LA MELATONINA EN LA NEURITIS ÓPTICA EXPERIMENTAL

Marcos L. Aranda; Damián Dorfman; Pablo H. Sande; Ruth E. Rosenstein
Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Facultad de Medicina, CEFyBO, UBA/CONICET.

En trabajos previos desarrollamos un nuevo modelo de neuritis óptica (NEO) experimental través de la microinyección de lipopolisacárido bacteriano (LPS) directamente en el nervio óptico, que reproduce características centrales de la NEO humana. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del tratamiento con melatonina (MEL) sobre las alteraciones axogliales del nervio óptico y de la retina inducidas por NEO experimental. Para ello, se inyectaron 4,5 μg de LPS en un nervio óptico y vehículo en el nervio contralateral de ratas *Wistar* macho adultas. Un grupo de animales recibió el implante de un *pellet* subcutáneo de MEL (20 mg) 1 día antes ó 4 días después de la inyección de LPS o vehículo. El efecto de la MEL se analizó a los 21 días post-inyección de LPS en términos de: i) función de la vía visual (potenciales visuales evocados (VEPs)), ii) transporte anterógrado desde la retina a sus áreas de proyección central, iii) reflejo pupilar consensual (RPC), iv) microglía/macrófagos (por inmunorreactividad para Iba-1 y ED1), v) reactividad astrocitaria (por inmunorreactividad para la proteína glial fibrilar ácida, vi) número de axones (azul de toluidina), vii) desmielinización (*luxol fast blue*), y viii) número de células ganglionares retinianas (CGRs) (por inmunorreactividad para Brn3a). El LPS indujo una disminución significativa en la amplitud de los VEPs y el RPC, un déficit en el transporte anterógrado, un aumento en la inmunorreactividad para Iba-1 y ED1 en el nervio óptico, astrocitosis, desmielinización y pérdida de CGRs y de axones del nervio óptico. El pre-tratamiento con MEL previno significativamente todos estos parámetros ($P \leq 0.01$ vs. LPS). El post-tratamiento con MEL evitó significativamente ($P \leq 0.01$ vs. LPS) la disminución de las amplitudes de los VEPs y el RPC inducida por la inyección de LPS. En suma, estos resultados sugieren que la melatonina podría constituir una nueva estrategia terapéutica en el tratamiento de la neuritis óptica.

258 (75) EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA N-CICLOPENTIL ADENOSINA EN LA DEGENERACIÓN RETINIANA INDUCIDA POR ILUMINACIÓN CONTINUA

Manuel Soliño; Ester María López; Noelí Martignone; Leonardo Juarez; Elena Girardi; Juan José López-Costa
IBCN

La iluminación continua (IC) produce la degeneración de los fotorreceptores generando un modelo que remeda muchas características de enfermedades degenerativas de la misma (Degeneración macular senil y retinitis pigmentosa). La adenosina funciona como molécula señal en numerosos tipos celulares. Es producido esencialmente por ectonucleotidasas en el espacio extracelular. Se han visto numerosas estrategias neuroprotectoras exitosas modulando este sistema. El objetivo de este trabajo es estudiar si el agonista del receptor A1, N-ciclopentil adenosina (CPA) tiene un efecto protector de la retina en la IC. Para esto se empleó la técnica inmunocitoquímica (ICQ) usando como marcador de apoptosis a la caspasa-3 activada (C3a) y como marcador de activación glial a la proteína GFAP. Se emplearon ratas Sprague Dawley (n=5), que fueron inyectadas en forma intravítrea en un ojo con CPA y en el otro con solución vehículo. Luego, fueron sometidas a IC (12000 lux) durante 1 día. Los ojos fueron procesados mediante ICQ empleando anticuerpos policlonales de conejo anti-GFAP (Dako) o anti-C3a (Sigma). Las imágenes fueron cuantificadas utilizando el analizador de imágenes Fiji y los datos fueron analizados estadísticamente con el programa GraphPad. Se midieron la fracción del área no teñida por GFAP y la densidad óptica (DO) de la capa nuclear externa (CNE) en las secciones marcadas con C3a. Los resultados preliminares muestran diferencias en la media del área GFAP negativa siendo significativamente mayor en ojos tratados con CPA (72,36% vs 48,83%; Test de Student a una cola, < 0,0001). Por otra parte, la DO media de C3a en la CNE de las secciones tratadas con CPA es menor en comparación con la observada en los CTL (0,19652 vs 0,289585, Test de Student, P< 0,001). Estos resultados señalan que agonistas del receptor A1, como CPA, ejercen un efecto neuroprotector de la retina en el modelo, y que A1 podría ser un potencial blanco terapéutico de enfermedades degenerativas.

259 (220) EVIDENCIAS DE LA TEMPRANA INVASIÓN DE MACRÓFAGOS DE SANGRE PERIFÉRICA, CÉLULAS NG2 Y EXPRESIÓN DE TROMBOSPONDINA 1 EN UN MODELO DE EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL

Alicia R Rossi; Veronica Murta; Alberto J Ramos
Laboratorio de Neuropatologia Molecular.IBCN. Facultad de Medicina. UBA

Evidencia clínica y experimental ha mostrado que la inducción del status epilepticus (SE), da lugar al comienzo de un periodo de latencia (PL) donde ocurre gliosis reactiva y neurodegeneración. Se especula que durante el PL ocurre sinaptogénesis reactiva con aparición de conexiones espúreas que son la base de la epileptogénesis. Trombospondina1 (TSP1) es una proteína con múltiples funciones que interviene en la sinaptogénesis inducida por los astrocitos, pero también es expresada por células endoteliales y macrófagos. El objetivo del presente trabajo fue investigar la participación de macrófagos infiltrantes de sangre periférica (BIC), células NG2+ y expresión de TSP1 durante el PL. Ratas Wistar fueron sometidas al modelo de epilepsia del lóbulo temporal por litio-pilocarpina (Rossi y col., 2013, PLOS One e78516). Un grupo de animales recibió 400mg/Kg del antagonista del receptor de TSP Gabapentina (Gp) durante 4 días y los animales se estudiaron a 3, 7 o 15 DPSE (días post-SE). A 3DPSE se observó una acumulación de células con fenotipo macrófago en estriado, hipocampo y corteza piriforme (CP) que precede a la gliosis reactiva y se detectó inmunomarcación para TSP1 en el endotelio y BIC en CP. A 7DPSE aparecieron células NG2+ en CP en zonas llamativamente libres de astrocitos reactivos. En esas zonas se observaron somas neuronales y células infiltrantes TSP1+ en hipocampo, estriado y CP. A 15DPSE la población de células NG2+ disminuyó y los astrocitos repoblaron la zona. En el grupo tratado con Gp la población de células NG2+ es menor.

Estos acontecimientos iniciales del PL muestran que luego del SE se produce una temprana invasión de BIC, probablemente por aumento en la permeabilidad vascular, donde TSP1 podría tener un papel importante. El aumento de NG2+ en zonas de exclusión de astrocitos junto con la presencia de células TSP1+ podría relacionarse con los fenómenos reconexión sináptica, aún antes de que la gliosis reactiva sea evidente.

Subsidios UBACYT /PICT 2012-1424 / CONICET PIP 387

260 (252) RETINOPATÍA INDUCIDA POR OXÍGE- NO (OIR): EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS PRO-ANGIOGÉNICAS Y DE DAÑO RETINAL COMO POSIBLES BLANCOS MOLECULARES PARA EL DESARROLLO DE ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS COMBINADAS

Magali Evelin Ridano[1]; Paula Virginia Subirada[1]; María Constanza Paz[1]; Diego Omar Croci[1]; José Domingo Luna[2]; Gabriel Adrián Rabinovich[3]; María Cecilia Sánchez[1]

Dpto. de Bioquímica Clínica - CIBICI-CONICET, Fac. de Ciencias Químicas, UNC, Córdoba, Argentina[1]. Centro Privado de Ojos Romagosa - Fundación VER, Córdoba, Argentina[2]. Lab. de Inmunopatología - IBYME-CONICET, Buenos Aires, Argentina[3].

La retinopatía proliferativa es uno de los desordenes neovasculares más severos asociado a ceguera. La hipoxia generada induce la expresión de VEGF y posterior neovascularización (NV). Interesantemente otras alteraciones, como la muerte neuronal, contribuyen a su progreso. Actualmente los tratamientos son poco exitosos, lo que ha incrementado la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas. Con este objetivo, utilizamos un modelo de OIR donde ratones C57BL6 de 7 días postnatales (P7) fueron expuestos a una etapa de hiperoxia (75% de 0_2) y luego de hipoxia relativa (21% de 0_2). Otro grupo de ratones de la misma edad fueron mantenidos en oxígeno ambiental (controles). Además, ratones OIR recibieron inyecciones intraoculares de anti-VEGF a P12, en dosis equivalente a la empleada en humanos o con solución salina como control. Los animales se sacrificaron a P17 (máxima NV) y P26 (regresión de la misma) evaluándose en retina la expresión de diferentes proteínas por ensayos de Western blot. La funcionalidad retinal fue analizada por electrorretinogramas (ERG). Se observó un pico en la expresión de proteínas pro-angiogénicas (VEGF y Gal-1) en P17 y P26. Ambas proteínas incrementaron significativamente su expresión en ratones OIR, revelando Gal-1 un pico adicional a P17. Proteínas involucradas en reactividad glial y detoxificación neuronal (GFAP y GS) incrementaron su expresión con los días de desarrollo en controles y en OIR. Sin embargo, el aumento de GFAP fue mayor en ratones OIR mientras que el de GS fue menor respecto a sus controles. El ERG mostró una disminución de amplitud y aumento de T. de latencia de la onda b en ratones OIR. Finalmente, el bloqueo de VEGF logró reducir el pico de expresión de esta citoquina a niveles del control pero no revirtió las alteraciones en la expresión de las otras proteínas evaluadas ni los cambios del ERG. Estos hallazgos demuestran la necesidad de estrategias terapéuticas combinadas para el tratamiento de enfermedades asociadas a NV.

261 (430) ESTRÉS OXIDATIVO EN SINAPTOSOMAS DE CORTEZA CEREBRAL Y ALTERACIONES CONDUCTUALES ASOCIADAS AL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO

Paulina Lombardi[1]; Analía G. Karadayian[1]; Lucas G. Asorey[2]; Rodolfo A. Cutrera[2]; Juanita Bustamante[3]; Silvia Lores-Arnaiz[1]

Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular[1] Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular[2] Centro de Altos Estudios de Ciencias Humanas y de Salud, Universidad Abierta Interamericana[3]

Durante el proceso de envejecimiento ocurren cambios en las mitocondrias que incluyen una reducción en la capacidad bioenergética y un aumento en la generación de radicales libres del oxígeno. Los objetivos de este estudio consistieron en evaluar parámetros de estrés oxidativo en sinaptosomas de corteza cerebral y caracterizar las alteraciones conductuales en el envejecimiento. Se utilizaron ratones macho Swiss de 3 y 20 meses de edad. Se evaluó la función motora y afectiva (*tightrope test* y *open field).* Posteriormente los animales fueron sacrificados y se aisló la fracción sinaptosomal de corteza cerebral mediante un gradiente de Ficoll. Los resultados mostraron una disminución del 40% en el rendimiento motor de los ratones de 20 meses. Además, se observó la manifestación de signos de símil-ansiedad como la disminución en la latencia de salida del centro y en el tiempo de permanencia en el cuadrante central ($p<0,05$) en el *open-field test*. Los animales de 20 meses mostraron signos compatibles con miedo: incremento en los episodios de *freezing* y en el número de deposiciones fecales ($p<0,01$). Los parámetros de estrés oxidativo evaluados mostraron un aumento del 24% en la producción de anión superóxido junto con un incremento del 21% de la oxidación de cardiolipina en sinaptosomas de corteza cerebral de ratones de 20 meses. Paralelamente se observó un aumento del 14% en la expresión de la proteína desacoplante UCP-2. Por último, el envejecimiento se asoció con un incremento de 40% en la actividad de acetilcolinesterasa. En base a los resultados obtenidos se concluye que en el envejecimiento se produce aumento de las especies reactivas del oxigeno e inducción de proteínas desacoplantes en sinaptosomas de corteza cerebral, de acuerdo con observaciones previas del laboratorio para ratones de 17 meses. La inducción de estrés oxidativo mitocondrial conduciría a una disfunción sináptica que se podría ver reflejada en las alteraciones motoras y afectivas descriptas.

262 (500) ESTUDIO IN VITRO E IN VIVO DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS INDUCIBLES POR FRÍO, CIRPY RBM3, EN LA RETINA EXPUESTA A HIPOTERMIA

Manuel Rey Funes[1]; Ignacio Larrayoz[2]; Daniela S. Contartese[1]; Federico Rolon[1]; Anibal Sarotto[1]; Dorfman Veronica B.[3]; Alfredo Martinez[2]; Cesar Fabian Loidl[14]

IBCN, Facultad de Medicina, UBA[1] Área Oncología, CIBIR, Logroño, España[2] Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnóstico (CEBBAD), Univ. Maimónides[3] Facultad de Medicina, Universidad Católica de Cuyo, San Juan[4]

La hipotermia es una terapia eficaz para prevenir o evitar el daño en el SNC. En general, ante la exposición al frío se reduce la expresión proteica, pero existen 2 proteínas cuya expresión aumenta, CIRP (Cold-inducible RNA binding protein) y RBM3 (RNA binding motif protein 3). Éstas se unen al ARNm estabilizándolo, lo cual impediría la traducción de proteínas de acción neurotóxica. El objetivo de este trabajo ha sido establecer su comportamiento tanto in vitro como in vivo por primera vez en la retina. Líneas de células de la retina R28 (retina neural de rata) y mRPE (epitelio pigmentario de la retina de mono) se expusieron a diferentes temperaturas y tiempos, para medir la expresión de RBM3 y CIRP mediante PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR) y Western Blot. Además, para el estudio in vivo se utilizaron ratas albinas Sprague-Dawley expuestas a un ambiente frío a 7-8°C, durante 15 min en ratas neonatas y durante 3 hs en ratas adultas (40 días PN). Las retinas fueron procesadas para el análisis molecular (QRT-PCR y Western Blot) o fijadas en paraformaldehído al 4% para análisis morfológico por inmunofluorescencia multiple (IFM) con anticuerpos contra CIRP, RBM3 y marcadores específicos de los diferentes tipos celulares de la retina. Las colocalizaciones se observaron con miscroscopía confocal. En ambas líneas celulares, aumentó significativamente la expresión de RBM3 y CIRP después de la exposición a un ambiente frío, siendo su pico a las 6 horas a 32 °C. En el estudio in vivo, las retinas de neonatos y adultos expuestos a hipotermia presentaron inmunorreactividad significativa para ambas proteínas con diferentes patrones de localización. Las IMF permitieron evidenciar la expresión tanto en neuronas como en glía de Müller y epitelio pigmentario así como establecer la colocalización de CIRP y RBM3. En condiciones de hipotermia, estas proteínas podrían ser las responsables de los efectos beneficiosos del frío a través de su unión específica al ARNm.

REPRODUCCIÓN 3

263 (2) LA CAFEÍNA POTENCIA LA TOXICIDAD TESTICULAR INDUCIDA POR LA COCAÍNA EN RATONES: EVIDENCIAS DE LA ACCIÓN DE PSICOESTIMULANTES SOBRE EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO LOCAL

Candela Rocío González[1]; Betina Gonzalez[2]; Mara Eugenia Matzkin[3]; Javier Andrs Muiz[2]; Jean Luc Cadet[4]; Edgar Garcia-Rill[5]; Francisco Jos Urbano[6]; Alfredo Daniel Vitullo[1]; Verónica Bisagno[2]

Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnóstico, Universidad Maimónides[1] Instituto de Investigaciones Farmacológicas, Universidad de Buenos Aires, CONICET[2] Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET[3] Molecular Neuropsychiatry Research Branch, USA[4] Department of Neurobiology and Developmental Sciences, University of Arkansas, USA[5] Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Universidad de Buenos Aires,CONICET[6]

Existen pocas evidencias del efecto que el consumo de psicoestimulantes tiene sobre la fisiopatología testicular y, particularmente, sobre el sistema catecolaminérgico local. El objetivo de este trabajo fue explorar posibles consecuencias tóxicas de la exposición crónica a cocaína, cafeína y su administración combinada, sobre la fisiología testicular en ratones adultos (C57BL/6) inyectados durante 13 días con cafeína (3x5 mg/kg), cocaína (3x10 mg/kg) y su administración combinada. Los ratones tratados solamente con cocaína o la combinación mostraron una reducción del volumen de los túbulos seminíferos junto con una reducción de espermatogonias DAZL-positivas ($p<0,05$), un aumento de la peroxidación lipídica y una disminución del ARNm de la enzima glutatión peroxidasa y del receptor de adenosina 1 (A1) ($p<0.05$). La combinación de cafeína y cocaína potenció la disminución de espermatogonias DAZL-positivas, de los niveles de ARNm de A1 y aumentó la expresión de la proteína pro-apoptotica BAX ($p<0,05$). Se inmunolocalizó la enzima tirosina hidroxilasa (TH) en células de Leydig y células germinales meióticas. Por otro lado, utilizando ratones transgénicos BAC-Drd1a-tdTomato y D2R-EGFP se detectó por primera vez la presencia de receptores de dopamina (DR) D1 y D2 en células de Leydig y DRD1 en las espermatogonias que no mostraron tinción para TH. Los tratamientos con cafeína, cocaína y/o su combinación aumentaron la expresión proteica de TH y disminuyeron los niveles de ARNm de DR en el testículo ($p<0,05$). En conclusión, estos resultados indican la existencia de toxicidad mediada por la administración de cocaína, cafeína o su combinación, sugiriendo un posible rol del sistema dopaminérgico local en patologías testiculares inducidas por psicoestimulantes. Estas alteraciones en el sistema dopaminérgico testicular podrían influenciar mecanismos epigenéticos conduciendo a la transmisión paterna de vulnerabilidad al abuso de sustancias.

264 (5) ALTERACIONES EN EL NIVEL INFLAMATORIO, ESTADO OXIDATIVO Y EVENTOS APOPTÓTICOS EN EL TESTÍCULO DE RATONES CON LONGEVIDAD ALTERADA

María Eugenia Matzkin[12]; Johanna Miquet[3]; Daniel Turyn[3]; Ricardo Saúl Calandra[1]; Andrzej Bartke[4]; Mónica Beatriz Frungieri[12]

IBYME[1]Cat. de Bioquímica Humana, Fac. de Medicina, Univ. de Buenos Aires[2] IQUIFIB[3] Univ.de Southern Illinois, USA[4]

Previamente hemos descripto la expresión diferencial de ciclooxigenasa 2, enzima clave en la síntesis de prostaglandinas, en células de Leydig y macrófagos (MAC) del testículo de ratones con envejecimiento acelerado/retardado. El objetivo de este trabajo fue estudiar el impacto de alteraciones en la longevidad sobre el desarrollo de procesos inflamatorios, el estado oxidativo y la ocurrencia de eventos apoptóticos en el testículo, parámetros que representan mecanismos fundamentales en el envejecimiento. Siendo que la hormona de crecimiento (GH) juega un rol clave en el balance envejecimiento/longevidad, se utilizaron ratones adultos normales (N) y modelos murinos de envejecimiento acelerado [por sobre-expresión de GH (GH-Tg)] o retardado [deficientes en la hormona liberadora de GH (GHRH-KO) y ratones enanos Ames Dwarf Prop1$^{-/-}$]. Se observó en el testículo de ratones con longevidad disminuida (GH-Tg *vs*. GH-N) un incremento significativo ($P<0,05$; n=5-7) en el número total de MAC testiculares Iba1-inmunopositivos, la producción de PGD2 (evaluada por enzimoinmunoanálisis), el nivel de estrés oxidativo (determinado por la producción de TBARS), la expresión de las enzimas antioxidantes catalasa, peroxirredoxina 1 y superóxido dismutasa 1 (analizada por PCR en tiempo real), el número de células germinales apoptóticas (evaluado por TUNEL) y la expresión de caspasa 3 clivada (determinada por inmunoblot). En el testículo de ratones con longevidad incrementada (GHRH-KO *vs*. GHRH-N y/o Ames-Dwarf *vs*. Ames-N) la expresión de las enzimas antioxidantes se mantuvo inalterada, mientras que los parámetros restantes se vieron significativamente disminuidos ($P<0,05$; n=5-7). En resumen, nuestros resultados destacan la relevancia del nivel inflamatorio, estado oxidativo y ocurrencia de eventos apoptóticos en el envejecimiento testicular. Así, procesos inflamatorios y el estrés oxidativo gatillarían mecanismos apoptóticos en el epitelio germinal de ratones con menor expectativa de vida.

265 (14) EFECTOS DE IDEBENONA, UN ANTIOXIDANTE MITOCONDRIAL, EN EL HÍGADO FETAL DE RATAS CON DIABETES GESTACIONAL INDUCIDA POR ANÓMALA PROGRAMACIÓN INTRAUTERINA

Daiana Fornes; Ivana Linenberg; M. Belen Mazzucco; Evangelina Capobianco; Alicia Jawerbaum

CEFYBO

La diabetes gestacional (GDM) es una enfermedad prevalente con consecuencias adversas en la madre y la descendencia. Nuestros estudios previos evidencian como la diabetes materna afecta los niveles de PPARg (receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma) y su coactivador PGC-1, y la consecuente transcripción de genes vinculados con el metabolismo y entorno proinflamatorio. El factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) cobra relevancia por su vinculación con el entorno proinflamatorio y potente efecto fibrogénico. La Idebenona (IDB) es un análogo artificial de la coenzima Q10. Objetivo: Evaluar el efecto de la administración de IDB materna sobre los niveles de PPARg, PGC-1 y CTGF en el hígado fetal de ratas con GDM. Metodología: Ratas sanas (control) y diabéticas (F0, obtenidas por administración de estreptozotocina) se aparearon con machos sanos. Las hembras se trataron con idebenona (100 mg/kg) o vehículo durante la gestación. Las crías en etapa adulta (F1) se cruzaron con machos sanos. Previo a la gestación de la F1 y en el día 21 de preñez se evaluaron parámetros metabólicos y en el hígado fetal se determinó la concentración lipídica por TLC y los niveles de PPARg, PGC-1, y CTGF por imunohistoquímica. Resultados: Las crías de ratas diabéticas presentaron GDM (hiperglucemia solo en la gestación, $p<0,05$). En el hígado fetal de ratas con GDM fueron mayores los niveles de triglicéridos (33%) y colesterol (30%) en relación al control ($p<0,05$). También fue mayor la expresión proteica de PPARg ($p<0,001$), la cual se redujo en el grupo GDM tratado con IDB ($p<0,001$). Los niveles de PGC-1, menores en el grupo GDM ($p<0,001$), no variaron con el tratamiento con IDB. Los niveles de CTGF fueron mayores en el hígado fetal de ratas GDM ($p<0,001$) y disminuyeron en el grupo IDB ($p<0,05$). Conclusión: El modelo de GDM inducido por alterada programación intrauterina presenta alteraciones en reguladores de procesos metabólicos y profibróticos en el hígado fetal, que en parte fueron regulados por el tratamiento con idebenona.

266 (27) ANEUPLOIDIAS EN ABORTOS ESPONTÁNEOS POST PROCEDIMIENTOS FIV/ICSI POR QF-PCR

Andressa Grazziotin Mondadori

Fecunditas

Son variadas las causas de interrupción del embarazo, adquiriendo mayor relevancia las anomalías cromosómicas en los del primer trimestre de la gestación. El estudio cromosómico

del producto de aborto considerado como el *gold standard* es el cariotipado de las metafases obtenidas por cultivo o por método directo de las vellosidades coriales, pero está reconocido un 40% de fallas en la obtención de resultados por la calidad del material remitido y además porque 60-80% dan cariotipos femeninos normales 46,XX, sin saber si corresponden al material embriofetal o a la madre. Presentamos los resultados del *screening* de aneuploidías con PCR fluorescente cuantitativa (QF-PCR) en 131 muestras de producto de aborto espontáneo del primer trimestre post tratamiento FIV/ICSI. Para el estudio se realizó una multiplex con el ADN extraído del producto abortado y de sangre periférica de los progenitores. Los STRs usados correspondieron a los cromosomas 2, 3, 4, 5, 7, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 21, 22, X e Y. El material amplificado fue analizado por electroforesis capilar fluorescente ABI prism 310 con Genescan software. De las 131 muestras, 55 de ellas evidenciaron los dos alelos maternos y ausencia del paterno, mientras que 86 evidenciaron corresponder al embrio-feto por presentar los alelos de los STRs de ambos progenitores. Se encontraron 19 trisomías autosómicas, 7 triploidías y una monosomía sexual. La mayoría (50-60%) de los abortos espontáneos del primer trimestre es debido a aneuploidías cromosómicas. En el presente estudio la tasa aneuploidía fue 31.4%. Estos resultados nos obliga a no descuidar las otras causales de aborto.

267 (45) PARTICIPACIÓN DEL PPARγ EN LA REGULACIÓN DEL METABOLISMO LIPÍDICO DE LA CÉLULA DE SERTOLI (CS)

Agostina Gorga; Gustavo Rindone; Maríana Regueira; Eliana Pellizzari; María Fernanda Riera; María Noel Galardo; Silvina Meroni
CEDIE - CONICET - FEI - Hospital R. Gutiérrez

La CS provee el soporte estructural y nutricional para las células germinales en desarrollo. Su metabolismo tiene características particulares. Convierte glucosa a lactato, principal sustrato energético para las células germinales, y utiliza ácidos grasos (AG) como fuente energética propia. Además, es capaz de sintetizar triglicéridos (TAGs) y almacenarlos en gotas lipídicas (GL). Diversos genes participan en dicho proceso: el transportador de AG FAT/CD36, las enzimas de síntesis de TAGs glicerol-fosfato-acil-transferasas (GPATs 1 a 4) y diacilglicerol-acil-transferasas (DGATs 1 y 2) y las proteínas involucradas en la formación de GL (PLINs 1 a 5). Recientemente demostramos que la activación de PPARα y β/δ (PPARs relacionados con el catabolismo lipídico) regula la expresión de genes involucrados en la oxidación de AG en la CS. Sin embargo no se conoce la participación del PPARγ (PPAR relacionado con el anabolismo de lípidos) en la regulación del metabolismo energético de la CS. El objetivo del trabajo fue analizar si la activación de PPARγ regula la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico y la formación de GL en CS. Cultivos de CS de ratas de 20 días de edad fueron incubados en condiciones basales o estimulados por 48 hs con Rosiglitazona (R, 10μM), activador farmacológico de PPARγ. Se determinaron los niveles de ARNm por RT-qPCR. Se observó que R estimula la expresión de FAT/CD36: 1.6±0,2*; GPAT1: 1.4±0,1* y PLIN1 2.3±0,3*; veces con respecto al basal (X±DS,*p<0.05, n=3). Coincidentemente con sus efectos anabólicos, se observó que R incrementa las GL. En su conjunto los resultados sugieren que la activación de PPARγ participa en la regulación de la expresión de genes vinculados con la síntesis de TAGs y formación de GL en la CS. Considerando que los AG son la principal fuente energética de la CS, el PPARγ jugaría un rol fundamental en la homeostasis lipídica de esta célula (PIP2011-187; PICT2012-666).

268 (73) EFECTOS DE METFORMINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LA CÉLULA DE SERTOLI

Gustavo Rindone; Agostina Gorga; Maríana Regueira; María Noel Galardo; María Del Carmen Camberos; Silvina Beatriz Meroni; María Fernanda Riera
CEDIE-CONICET-FEI-Htal R. Gutiérrez

Se conoce que las células de Sertoli (SC) proliferan durante el periodo fetal y neonatal en la rata, luego dejan de proliferar y comienzan el proceso de diferenciación terminal. El número de CS alcanzado en los periodos proliferativos es crítico ya que determinará la capacidad espermatogénica de los animales adultos. Estudios previos del laboratorio muestran que un activador farmacológico de la kinasa activada por AMP (AMPK), A769662, lleva a una inhibición de la proliferación de la CS y que dicha inhibición es mediada por un aumento en la expresión de inhibidores del ciclo celular. Por otro lado, ha sido reportado que Metformina (Met), droga utilizada para el tratamiento de la diabetes tipo II, presenta efectos mediados y no mediados por AMPK y que es capaz de detener la proliferación de varios tipos celulares. Teniendo en cuenta dichos antecedentes, nos propusimos evaluar si Met es capaz de activar AMPK y de regular la proliferación de las CS. Se utilizaron cultivos de CS de ratas de 8 días de edad. Se incubaron las células en condiciones basales o con Met (10mM) por 24 hs. Finalizado el tratamiento se determinaron los niveles de AcetilCoa Carboxilasa fosforilada (ACC-P) como parámetro de activación de AMPK. Para evaluar los efectos sobre la proliferación se realizó un recuento celular y se determinaron los niveles de ARNm de los inhibidores del ciclo p21 y p27 (familia CIP/KIP) por RT-qPCR. Se observó que Met incrementa los niveles de ACC-P. Además, observamos que el tratamiento con Met disminuye el número de CS sin modificar el número de células no viables y que incrementa los niveles de ARNm de p21 mientras que no modifica los de p27 (p21:3.6±1.5*; p27: 0.9±0.15 ns). Los resultados se expresan como veces de variación respecto al basal (X±DS,*p<0.05 vs basal, n=3). En conjunto los resultados sugieren que Met en CS activa a AMPK e inhibe la proliferación de la CS a través, al menos de parte, de la regulación de la expresión del inhibidor p21.

269 (111) EXPRESIÓN DE COMPONENTES DE LA SUPERFAMILIA TGF-β EN OVARIOS BOVINOS EN UN MODELO DE PERSISTENCIA FOLICULAR INDUCIDA CON PROGESTERONA

Valentina Matiller; Pablo Uriel Daz; Fernanda Mariel Rodrguez; Florencia Rey; Hugo Hctor Ortega; Natalia Raquel Salvetti
Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada Icivet Litoral UNL CONICET

Resultados obtenidos con anterioridad nos han permitido observar que existen cambios importantes en la expresión de componentes de la familia del TGF-β: TGF-β1 y sistema inhibina/activina/foliculostatina, en folículos en crecimiento y en quistes en ovarios de bovinos lecheros con Enfermedad Quística Ovárica (COD). En consecuencia, y ante su importante participación autócrina y parácrina en la reproducción, el objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de los citados ligandos, en ovarios de animales con persistencia folicular inducida mediante un modelo experimental basado en dosis subluteales de progesterona para determinar si esos cambios se presentan desde el inicio del desarrollo de la enfermedad. Se obtuvieron los ovarios mediante ovariectomía a los 5 (P5, n=5), 10 (P10, n=5) y 15 (P15, n=5) días de persistencia desde el momento esperado de la ovulación. El grupo control fue ovariectomizado en proestro (C, n=5). Sobre secciones de 4um de espesor se determinó la presencia de las proteínas citadas mediante inmunohistoquímica indirecta. Mediante análisis digital de imágenes se cuantificó la inmunoexpresión en relación al tiempo de persistencia y a folículos de animales controles. Se evidenció una disminución en la expresión de TGF-β1 en los folículos de P15 en relación a los de P5 (p<0,05). Los folículos persistentes del grupo P15 mostraron una mayor expresión de activina en la granulosa que los folículos antrales controles (p<0,05). Se observaron diferencias en la expresión de foliculostatina en granulosa dentro del grupo P10 entre folículos antrales y persistentes (p<0,05). El desbalance hallado entre los componentes del sistema inhibina-activina-foliculostatina así como en TGF-β1 contribuiría en el desarrollo de la enfermedad desde momentos muy tempranos avalando los resultados encontrados en los casos de COD.

270 (116) EFECTOS DE LA VÍA DEL AMPC SOBRE LA ACCIÓN DEL ESTRADIOL EN LA EXPRESIÓN DE LEPTINA PLACENTARIA

Malena Schanton[1]; Antonio Perez-Perez[2]; Yesica Gambino[1]; Bernardo Maskin[3]; Victor Sanchez Margalet[2]; Cecilia Varone[1]
Departamento de Química Biológica, FCEN-UBA. IQUIBICEN, CONICET.[1] Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla, Sevilla, España[2] Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas, Buenos Aires, Argentina.[3]

La leptina es una proteína expresada en placenta que durante la gestación regula la implantación y el desarrollo embrionario. Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que el estradiol (E_2) regula la expresión de leptina placentaria a nivel transcripcional involucrando efectos genómicos y no genómicos. Previamente demostramos que CREB regularía la expresión basal de leptina. El objetivo del presente trabajo es estudiar el efecto de vía AMPc sobre la acción del E_2 en la expresión de la leptina placentaria. Se utilizaron células BeWo y explantos de placenta humana a término como modelos experimentales. Al utilizar los inhibidores de la vía de PKA, H89 y SQ22536, se observó por Western blot y por ensayos de genes reporteros, una disminución de la expresión de leptina mediada por E_2, lo cual sugiere que el cAMP ejerce un efecto sobre la inducción de leptina por E_2. Por otro lado se demostró que la sobreexpresión de CBP (proteína de unión a CREB con función de acetiltransferasa) produce un aumento en el efecto de E_2 sobre la expresión de leptina. También se observó, en transfecciones transitorias, que la sobreexpresión de HDAC-1, una histona deacetilasa, disminuyó la inducción de E_2 sobre leptina sugiriendo que las modificaciones en acetilaciones de histonas podrían estar involucradas en su acción. Estos resultados proveen nuevas evidencias acerca de los mecanismos por los cuales el E_2 regula la expresión de la leptina placentaria. Futuros ensayos permitirán estudiar en detalle los complejos proteicos formados entre en el promotor de leptina en respuesta a E_2.

271 (124) EVALUACIÓN DE IL-1β, IL-4 E IL-6 EN SUERO Y LÍQUIDO FOLICULAR EN LA ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA BOVINA Y DURANTE LA PERSISTENCIA FOLICULAR INDUCIDA

Antonela Florencia Stassi; Eduardo Matías Belotti; María Eugenia Baravalle; Natalia Raquel Salvetti; Florencia Rey; Hugo Héctor Ortega
Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada ICIVET LITORAL UNL CONICET

La ovulación posee diversas características similares a una reacción inflamatoria siendo las citoquinas determinantes en este proceso. En el ovario, las citoquinas son secretadas por células del sistema inmune y por células de la granulosa y de la teca. La enfermedad quística ovárica (COD) constituye una de las causas más comunes de infertilidad en bovinos lecheros y la persistencia folicular asociada es una de sus principales características. Considerando que la ovulación es un proceso inflamatorio localizado, una alteración en estos mediadores podría contribuir a la patogenia de la COD. El objetivo fue evaluar la concentración de las citoquinas IL6, IL4 e IL1β en líquido folicular (LF) y suero de vacas con COD espontánea y con persistencia folicular inducida mediante progesterona (P4). Se realizó la toma de muestras de sangre y ovariectomía para la obtención de ovarios con quistes foliculares espontáneos. Se generó un modelo experimental de persistencia folicular, aplicando dispositivos de liberación lenta de P4 para lograr concentraciones subluteales de P4 en sangre, obteniéndose folículos dominantes cercanos a la ovulación (n=5; P0) y folículos que persistieron por 5 (n=5; P5), 10 (n=5; P10) o 15 días (n=5; P15) luego del momento esperado para la ovulación. Los controles fueron ovariectomizados en proestro (n=5; C). Se obtuvo LF y suero, sobre los que determinó mediante ELISA, la concentración de las citoquinas IL6, IL4 e IL1β. Las muestras de suero del grupo P10 mostraron mayores concentraciones de IL6 con respecto a los grupos P0, COD y C ($p<0.05$), mientras que en LF los niveles de las citoquinas fueron similares en todos los grupos ($p>0.05$). Esto junto a resultados previos acerca de la expresión de citoquinas en las células de folículos persistentes y quistes, nos permiten sugerir que existe una alteración en los mecanismos inflamatorios asociados a la ovulación y que las interleuquinas podrían contribuir a la persistencia folicular asociada con la COD.

272 (152) ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ROS) COMO INTERMEDIARIAS EN EL MECANISMO DE ACCIÓN DE PROSTAGLANDINA D2 (PGD2) EN CÉLULAS DE SERTOLI MURINAS TM4

Soledad Paola Rossi[12]; Stefanie Windschuettl[3]; Verónica Rey Ares[3]; Ricardo Saúl Calandra[1]; Artur Mayerhofer[3]; Mónica Beatriz Frungieri[12]
IBYME[1] Cat. Bioquímica Humana, Fac. de Medicina, Univ. de Buenos Aires[2] Institute Of Anatomy and Cell Biology, Munich, Alemania[3]

Las células de Sertoli (CS) brindan soporte estructural y metabólico a las células germinales durante la espermatogénesis siendo el lactato el principal sustrato energético producido. Previamente, hemos descripto un efecto estimulatorio sobre la producción de ROS ejercido por PGD2 en CS murinas TM4 y la consecuente activación del sistema anti-oxidante en respuesta al estrés oxidativo generado. En este trabajo hemos detectado que PGD2 estimula la producción de H_2O_2 en CS. Es sabido que las ROS no solo generan peroxidación lipídica y daño tisular, sino también participarían como segundos mensajeros intracelulares regulando la expresión de ciertos genes. El objetivo de este trabajo fue investigar si las ROS producidas en respuesta a PGD2 en CS murinas TM4, actúan como segundos mensajeros modulando la transducción de señales y la expresión génica. PGD2 (1μM) aumentó el grado de fosforilación (Western blot, 15 min de incubación) de p-Akt y p-CREB, efecto que fue revertido en presencia del agente anti-oxidante N-acetil-L-cisteína (NAC; 5mM) en CS TM4 [unidades arbitrarias (UA), p-Akt/Akt = control: $1\pm0,09^a$; PGD2: $1,57\pm0,10^b$; PGD2 + NAC: $0,73\pm0,06^c$; NAC: $0,64\pm0,05^c$; p-CREB/actina = control: $1\pm0,09^a$; PGD2: $1,59\pm0,12^b$; PGD2 + NAC: $0,62\pm0,05^c$; NAC: $0,79\pm0,09^{a,c}$; X±SEM; diferentes letras: $P<0,05$]. PGD2 también estimuló la expresión [PCR en tiempo real (qPCR), 30 min de incubación] de lactato deshidrogenasa A (LDH-A) en CS TM4. Este efecto fue revertido en presencia de NAC (UA, control: $1\pm0,09^a$; PGD2: $3,04\pm0,20^b$; PGD2 + NAC: $1,85\pm0,18^c$; NAC: $1,11\pm0,10^a$; X±SEM; diferentes letras: $P<0,05$). La incubación de CS TM4 en presencia de LY 294002 (LY; 10μM), inhibidor de la quinasa PI3 asociada a la fosforilación de Akt, revirtió la inducción por PGD2 de la expresión de LDH-A ($P<0,05$). En resumen, estos resultados sugieren que las ROS generadas por PGD2 en CS murinas TM4 actuarían como segundos mensajeros regulando la expresión de LDH-A a través de la vía de Akt/CREB.

273 (164) TRATAMIENTOS MATERNOS CON ANTIOXIDANTES MITOCONDRIALES EN RATAS DIABÉTICAS PREVIENEN ALTERACIONES PRO-INFLAMATORIAS EN LA PLACENTA DE SU DESCENDENCIA QUE DESARROLLA DIABETES GESTACIONAL

Ivana Linenberg; Daiana Fornes; Verónica White; Alicia Jawerbaum; Evangelina Capobianco
CEFYBO

La diabetes materna conduce a una anómala programación intrauterina de diabetes gestacional en su descendencia. La diabetes induce un entorno pro-oxidante intrauterino y anomalías en las vías de los Receptores Activados por Proliferadores Peroxisomales (PPAR), que regulan procesos anti-oxidantes y anti-inflamatorios. El factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) se vincula con eventos pro-inflamatorios. Objetivos: Realizar tratamientos maternos con antioxidantes mitocondriales en ratas con diabetes pre-gestacional, a fin de estudiar su efecto sobre la placenta de su descendencia hembra que desarrollará diabetes gestacional. Métodos: Ratas Wistar sanas (C) y diabéticas (D, glucemias 180-220 mg/dl) fueron tratadas con vehículo o antioxidantes mitocondriales: Idebenona (IDE, 100 mg/kg/día) o MitoQ (MQ, 17mg/kg/día) desde el día 1 de gestación hasta el parto. La descendencia hembra de ratas C y D se apareó con

machos sanos. La descendencia de ratas D desarrolló diabetes gestacional (ratas GDM). Se realizó la eutanasia en el día 21 de gestación y en las placentas se determinó: la producción de óxido nítrico (NO, dosaje de nitratos/nitritos, sus metabolitos estables); y los niveles de CTGF, PPAR y nitrotirosina (NT, índice de daño por peroxinitritos), mediante inmunohistoquímica. Resultados: Los niveles de PPAR fueron menores en placentas de ratas GDM al comparar con C (66%, p<0,05) y los tratamientos con IDE y MQ no modificaron dichos niveles. Los niveles de CTGF fueron mayores en placentas de ratas GDM (58%, p<0,05) al comparar con C, y se redujeron con los tratamientos IDE y MQ (80%, p<0,01). Los elevados niveles de NO (p<0,01) y NT (p<0,001) en placentas de ratas GDM, fueron reducidos mediante los tratamientos con IDE y MQ (p<0,05). Conclusiones: El tratamiento materno con antioxidantes mitocondriales en ratas con diabetes pre-gestacional, regula parámetros pro-oxidantes y pro-inflamatorios en la placenta de su descendencia que desarrolla diabetes gestacional.

274 (167) APOPTOSIS Y CUERPO DE BALBIANI EN LA GÓNADA FEMENINA HUMANA EN DESARROLLO: ANÁLISISINMUNOHISTOQUÍMICO

Analia Meilerman Abuelafia[12]; Nicolas Fraunhoffer[12]; Ines Stella[2]; Silvia Galliano[23]; Veronica Dorfman[1]; Marcela Barrios[2]; Alfredo Vitullo[1]
Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnóstico[1] Carrera de Medicina-Universidad Maimónides[2] Servicio de Anatomía Patológica-Hospital de Eva Perón de Merlo[3]

A partir de 7 millones de oogonias originadas durante el periodo fetal, al inicio de la pubertad quedarán 300.000 oocitos viables de los cuales sólo alrededor de 400 sobrevivirán para ser liberados para su potencial fertilización. Por lo tanto, más del 99,9% de la masa germinal habrá sido eliminada al final del periodo reproductivo por APOPTOSIS. El balance entre las proteínas pro y antiapoptóticas de la familia BCL2 es responsable de la sobrevida o la muerte de la célula germinal. El cuerpo vitelino de Balbiani es una colección de organelas localizadas de forma adyacente al núcleo en oocitos muy jóvenes. Se sospecha que la localización diferencial de las proteínas de esta familia en relación al cuerpo de Babiani determinaría el destino de la célula germinal. El objetivo del presente trabajo fue analizar la inmunolocalización de la proteína antipoptótica BCL-2 y proapoptóticas BAX y BID clivado en relación al cuerpo de Balbini en 27 ovarios fetales humanos con diagnóstico histológico normal de la masa germinal, entre la semana 8 y 39 de gestación mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. BCL-2, BAX y BID clivado se detectan en el cuerpo de Balbiani en estadios de oogonia, oocitos desnudos y contenidos en folículos primordiales, mientras que en oocitos contenidos dentro de folículos primarios y secundarios, se detectan de manera homogénea. En conclusión, estos resultados sugieren que estas proteínas están secuestradas en Balbiani en tanto y en cuanto el oocito permanece en el pool quiesciente y se distribuyen en el citoplasma al ingresar en el pool folicular en crecimiento.

275 (192) RELEVANCIA DEL FENÓMENO DE ANGIOGÉNESIS EN EL DESARROLLO DE UN CUADRO DE ORQUITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL ASOCIADO A INFERTILIDAD

Gisela S. Gualdoni; Patricia Jacobo; Cristian M. Sobarzo; Livia Lustig; M. Susana Theas; Vanesa A. Guazzone
INBIOMED. UBA-CONICET.Facultad de Medicina.

La orquitis autoinmune experimental (OAE) es un cuadro caracterizado por un infiltrado linfomonocitario intersticial y daño de los túbulos seminíferos (TS) que sufren apoptosis y descamación de las células germinales resultando en aspermatogénesis e infertilidad. Dicho cuadro se acompaña de un aumento del número de vasos que componen la red microvascular del testículo. El objetivo de este trabajo fue evaluar la relevancia del proceso de angiogenesis mediado por VEGF en el desarrollo de la OAE. Ratas Wistar macho adultas fueron inmunizadas con antígenos espermáticos y adyuvantes durante los días 0, 14 y 28 y posteriormente sacrificadas a los 60 días de la primera inmunización. Por inmunohistoquímica, se observó en el testículo de ratas con OAE la expresión del VEGF en las células germinales, endoteliales y macrófagos. Y la expresión de su receptor-1 (Flt-1) en células endoteliales, macrófagos y de Leydig. Por otra parte, ratas con OAE fueron inyectadas semanalmente con bevacizumab (Avastin, Roche) o solución fisiológica (vehículo) luego del período de inmunización. Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal con capacidad de neutralizar la actividad del VEGF. En las ratas inyectadas con bevacizumab se observó una disminución significativa de la incidencia y severidad del cuadro de OAE (índice de OAE: vehículo: 5,36±1,41 vs bevacizumab: 0,82±0,63 p=0.01) así como una disminución del grado de inflamación testicular (vehículo: 2,57±0,75 vs bevacizumab: 0,1±0,1 p=0.001). Por morfometría, se cuantificó el número de vasos testiculares, detectándose una disminución significativa en las ratas que recibieron bevacizumab (Nro. vasos/100 TS: vehículo: 137,9±4,1 vs bevacizumab: 121,1±4,5 p=0,04). Los resultados obtenidos hasta el momento demuestran la relevancia del sistema VEGF-VEGFR en el desarrollo de un cuadro de inflamación testicular y el potencial uso del bevacizumab como herramienta terapeútica en el tratamiento de la infertilidad asociada a mecanismos inmunológicos.

276 (200) HEPARÁN SULFATO Y SU PAPEL EN EL RECONOCIMIENTO ESPERMATOZOIDE-OVIDUCTO EN HUMANOS

Yamila Raquel Juárez[1]; Camila Galotto[1]; Santiago Gil[2]; Vanina Julianelli[3]; Sebastin Gogorza[2]; Lucrecia Pieiro De Calvo[1]; Juan Carlos Calvo[14]; Marina Romanato[1]
IBYME[1] Servicio de Ginecología y Obstetricia, Hospital Italiano de Buenos Aires.[2] PROCREARTE[3] Departamento de Química Biológica, FCEyN-UBA[4]

Describimos previamente que el heparán sulfato (HS) es fundamental en la descondensación cromatínica espermática durante la fecundación y que se encuentra en el ooplasma y espacio perivitelino de los oocitos. Objetivo: Estudiar la presencia de HS en el espermatozoide lavado, capacitado y reaccionado y su posible rol en la interacción con células oviductales en cultivo. El protocolo y los Consentimientos Informados han sido aprobados por los Comités de Ética del HIBA y del IBYME. Metodología: Los espermatozoides se obtuvieron de individuos normozoospérmicos (OMS) y se procesaron para obtener la fracción mótil por swim-up. Se capacitaron y se indujo la reacción acrosomal con ionóforo de calcio. La presencia de HS se analizó por citometría de flujo, con anticuerpo anti-HS y segundo anticuerpo marcado con FITC. Las muestras de oviducto se obtuvieron de pacientes premenopáusicas, sin infecciones o enfermedades neoplásicas, por laparoscopía o histerectomía y se procesaron dentro de las 2 h. Luego de separar el tejido conectivo, se cortaron longitudinalmente para exponer el interior y, por raspado, obtener las células. Para la interacción, se preincubaron las células confluentes con heparina 46 µM o medio y, luego de lavar, se agregaron los espermatozoides. Se fijaron las células con glutaraldehído, fotografiaron 20 campos y contaron los espermatozoides unidos. Resultados: El HS permanece unido al espermatozoide, incluso aumenta luego de la reacción acrosomal (lavados vs capacitados, NS; lavados vs reaccionados, p<0.0035 y capacitados vs reaccionados p<0.025; ANOVA-Tukey, n=5). El agregado de heparina disminuyó el número de espermatozoides asociados a las células oviductales (p<0.0001, t apareado). Conclusión: la permanencia del HS sobre la superficie del espermatozoide, asociada al bloqueo de la interacción con las células oviductales por heparina, indicaría un posible rol del HS en la interacción con el oviducto, además del ya descripto en la descondensación cromatínica. SUBSIDIOS: CONICET-ANPCYT-Fundación René Barón

277 (216) EVIDENCIAS DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE FACTORES DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO (FGFRS) FUNCIONALES EN ESPERMATOZOIDES MURINOS

Lucia Saucedo[1]; Adrian Gongora[1]; Cristian Sobarzo[2]; Monica Vazquez-Levin[1]; Clara Marin Briggiler[1]

IBYME[1] INBIOMED[2]

Es ampliamente conocido que los receptores de factores de crecimiento fibrobástico (FGFRs) participan en la proliferación, diferenciación, motilidad y apoptosis de células somáticas. Sin embargo, existen escasas evidencias sobre su expresión y función en las gametas. En trabajos previos describimos la presencia de los FGFR1, 2, 3 y 4 en los espermatozoides humanos, que la exposición al ligando FGF2 desencadena su activación y la de vías de señalización relacionadas, y estimula la motilidad espermática. Dado que los estudios en el modelo humano presentan limitaciones éticas, es necesaria la utilización y validación del sistema en modelos animales. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la presencia de los FGFRs en espermatozoides murinos y determinar su origen tisular y su funcionalidad. Se realizaron ensayos de Western immunoblotting e inmunocitoquímica sobre espermatozoides recuperados del epidídimo de ratones macho adultos, y ensayos de inmunohistoquímica sobre secciones de testículo, utilizando anticuerpos anti FGFRs. Los espermatozoides fueron expuestos a FGF2 recombinante y se evaluaron la activación de vías de señalización y la motilidad espermática. Los resultados mostraron que los FGFR1, 2, 3 y 4 están expresados en los espermatozoides murinos, localizados en el flagelo y en la región acrosomal. La localización flagelar se mantuvo en los espermatozoides luego de la incubación en condiciones capacitantes. Los FGFRs espermáticos son de origen testicular, ya que su presencia fue evidenciada en las células germinales del epitelio seminífero y en el flagelo de los espermatozoides testiculares. La incubación con FGF2 por 1 hora condujo a un aumento en la fosforilación de Akt espermática y del porcentaje de espermatozoides mótiles. En conclusión, los espermatozoides murinos expresan FGFRs funcionales y este modelo podría ser utilizado para caracterizar la participación del sistema FGFs/FGFRs en la regulación de la fisiología espermática.

278 (249) ALTERACIONES EN EL DESARROLLO REPRODUCTIVO EN RATAS MACHOS Y HEMBRAS CAUSADAS POR SOBREPESO MATERNO

Rocío A Galarza; Eric A Rhon Calderón; Analía E Cortez; Alicia G Faletti
CEFYBO-CONICET, Facultad de Medicina-UBA

La obesidad y el sobrepeso están asociados con alteraciones reproductivas incluyendo complicaciones durante el embarazo y el parto. Para permitir una programación fetal adecuada, se necesita un peso corporal materno apropiado. El objetivo de este trabajo fue estudiar las alteraciones reproductivas en ratas machos (M) y hembras (H) causadas por sobrepeso materno. Para ello, utilizamos ratas adultas alimentadas con dieta estándar (DE 18.4 kJ/g; 11.4% lípidos, 71.4% carbohidratos, 17.2% proteínas) o con dieta de cafetería con alto contenido lipídico (DC 24.1 kJ/g; 30% lípidos, 52.8% carbohidratos, 17.2% proteínas) ad libitum a partir de los 21 días hasta el destete de sus crías. Cuando estos animales alcanzaban sobrepeso entre 20 y 36% comparado con los controles, fueron apareadas con machos alimentados con DE. Las crías fueron alimentadas con DE y se registró la evolución de ambos grupos (C: crías de madres DE; D: crías de madres DC). Comparada con C, las crías D exhibían aumento de peso corporal (H 39%, M 29%, p<0.001), apertura vaginal retrasada (1-3 ds, p<0.05), mayor peso ovárico (28%, p<0.01) y testicular (10%, p<0.01) y aumento en la tasa ovulatoria (129%, p<0.05), expresada como el número de oocitos ovulados por rata. Asimismo, los M presentaban menor recuento espermático (40±4 y 37±6, p<0.01) en función del sobrepeso materno (26%, 36%), expresado en millones de células/ml respecto a los controles (69±7), y las hembras exhibían menor número de folículos primordiales (Po 2.5±0.3), primarios (Pi 2.1±0.3) y antrales (A 1.3±0.1), determinado por histología ovárica, expresado por área y comparado con los controles (Po 5.7±0.7, Pi 4.1±0.4, A 2.0±0.2, p<0.01). Estos resultados indican que el sobrepeso materno es capaz de alterar el desarrollo reproductivo en la rata ya que i) las hembras presentaban pubertad retrasada, reserva folicular disminuida y mayor tasa ovulatoria; y ii) los machos exhibían menor número de espermatozoides en función del sobrepeso.

279 (259) LOS RATONES DOBLE KNOCKOUT PARA LA PROTEINAS EPIDIDIMARIAS CRISP1 Y CRISP4 PRESENTAN DEFICIENCIAS EN SU FERTILIDAD

Guillermo Carvajal[1]; Nicolás Brukman[1]; Pablo Torres[2]; Daniel Lombardo2; Mariana Weigel Muñóz[1]; Patricia Cuasnicú[1]
IBYME[1] Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (FVet-UBA)[2]

CRISP1 y CRISP4 son proteínas de expresión epididimaria que se asocian a los espermatozoides durante la maduración y participan en las etapas de unión a la Zona Pellucida (CRISP1 y CRISP4) y de fusión de gametas (CRISP1). Sin embargo, los ratones knockout (KO) tanto para Crisp1 como para Crisp4 son fértiles en forma individual, sugiriendo la existencia de mecanismos compensatorios entre proteínas homólogas. En base a ello, el objetivo de este trabajo consistió en generar ratones deficientes en ambas proteínas simultáneamente y evaluar su fenotipo reproductivo. Los resultados indicaron que los animales doble KO (KO/KO) para CRISP1 y CRISP4, generados mediante cruzas de los animales simples KO, eran subfértiles a juzgar por el menor número de crías por camada obtenidas para los mismos respecto a los animales control (WT/WT) (WT/WT 7,8±0,5 vs KO/KO 5,0±0,9; n=9 p<0,05). Consistente con este resultado, se observó un menor número de ovocitos fertilizados en el oviducto de hembras apareadas con machos KO/KO respecto al control (WT/WT 70,5±7,2 vs KO/KO 49,5±8,7; n=6 p<0,01) y un menor porcentaje de ovocitos fertilizados en ensayos in vitro (WT/WT 43,6±11,8 vs KO/KO 2,2±1,3; n=5 p<0,05). Si bien los espermatozoides KO/KO mostraron un normal número y motilidad, exhibieron un mayor porcentaje de reacción acrosomal espontánea (WT/WT 29,1±2,8 vs KO/KO 39,4±5,3; n=6 p<0,05) y no respondieron a la inducción de la reacción acrosomal por progesterona. En conjunto, estos resultados no sólo apoyan la existencia de una cooperación funcional entre CRISP1 y CRISP4 para garantizar la fertilización sino que muestran la relevancia de estas proteínas para la fertilidad de un individuo, con implicancias clínicas tanto para el tratamiento de la infertilidad como para el desarrollo de nuevos métodos anticonceptivos. CRISP1 y CRISP4 son proteínas de expresión epididimaria que se asocian a los espermatozoides durante la maduración y participan en las etapas de unión a la Zona Pellucida (CRISP1 y CRISP4) y de fusión de gametas (CRISP1). Sin embargo, los ratones knockout (KO) tanto para Crisp1 como para Crisp4 son fértiles en forma individual, sugiriendo la existencia de mecanismos compensatorios entre proteínas homólogas. En base a ello, el objetivo de este trabajo consistió en generar ratones deficientes en ambas proteínas simultáneamente y evaluar su fenotipo reproductivo. Los resultados indicaron que los animales doble KO (KO/KO) para CRISP1 y CRISP4, generados mediante cruzas de los animales simples KO, eran subfértiles a juzgar por el menor número de crías por camada obtenidas para los mismos respecto a los animales control (WT/WT) (WT/WT 7,8±0,5 vs KO/KO 5,0±0,9; n=9 p<0,05). Consistente con este resultado, se observó un menor número de ovocitos fertilizados en el oviducto de hembras apareadas con machos KO/KO respecto al control (WT/WT 70,5±7,2 vs KO/KO 49,5±8,7; n=6 p<0,01) y un menor porcentaje de ovocitos fertilizados en ensayos in vitro (WT/WT 43,6±11,8 vs KO/KO 2,2±1,3; n=5 p<0,05). Si bien los espermatozoides KO/KO mostraron un normal número y motilidad, exhibieron un mayor porcentaje de reacción acrosomal espontánea (WT/WT 29,1±2,8 vs KO/KO 39,4±5,3; n=6 p<0,05) y no respondieron a la inducción de la reacción acrosomal por progesterona. En conjunto, estos resultados no sólo apoyan la existencia de una cooperación funcional entre CRISP1 y CRISP4 para garantizar la fertilización sino que muestran la relevancia de estas proteínas para la fertilidad de un individuo, con implicancias clínicas tanto para el tratamiento de la infertilidad como para el desarrollo de nuevos métodos anticonceptivos.

280 (268) LEPTINA DISMINUYE LOS VALORES DE VIDA MEDIA DE P53 EN CÉLULAS PLACENTARIAS DE PRIMER TRIMESTRE

Paula Balestrini[1]; Ayelén Toro[1]; Antonio Pérez-Pérez[2]; Maríana Jaime[3]; Bernardo Maskin[3]; Víctor Sánchez-Margalet[2]; Cecilia L. Varone[1]
Dpto Química Biológica FCEN UBA - IQUIBICEN , Conicet[1] Dpto. de Bioquímica Médica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla, Sevilla, España[2] Hospital Nacional Alejandro Posadas, Buenos Aires, Argentina[3]

Durante la implantación embrionaria se genera un dialogo materno-fetal que involucra la acción de diferentes reguladores, entre ellos la leptina. Esta proteína de 16 kDa fue descubierta en tejido adiposo con la función de regular el balance energético del organismo pero luego se encontró que se expresa en placenta humana teniendo funciones sobre el crecimiento y la inmunomodulación placentaria. Resultados previos de nuestro grupo demostraron que la leptina aumenta la sobrevida en células placentarias. Con el objetivo de profundizar el estudio de la acción antiapoptótica de leptina nos planteamos evaluar el efecto de dicha hormona sobre los niveles de expresión y vida media de p53, regulador clave del ciclo celular. Se utilizó como modelo experimental la línea celular Swan-71 y explantos de placenta humana a término incubados en medio 1% SFB. También se analizaron los niveles de p53 luego del tratamiento con 100 y 250 uM cloruro de cobalto, droga que estabiliza la expresión de HIF-1. Mediante qRT-PCR y Western blot se determinó que la leptina disminuye significativamente los niveles de expresión de p53 de manera dosis dependiente, por otro lado se observó que genera un aumento de Mdm-2, regulador negativo de p53. Para evaluar el efecto de leptina sobre la vida media de p53 se realizaron similares experimentos en presencia de cicloheximida. Nuestros resultados demostraron que los valores de vida media de p53 (24.03 ± 0.39 h) disminuyen en presencia de leptina (15.85 ± 1.52 h). Por otro lado se sabe que existe un cross-talk entre los factores de transcripción p53 y HIF-1, ya que se ha evidenciado la acumulación de ambos factores en condiciones de hipoxia. En estas condiciones leptina disminuyó los niveles de p53 en células Swan-71. Estos resultados permiten profundizar en el estudio de la acción antiapoptótica de leptina, en particular sobre los niveles de p53, proteína involucrada en procesos críticos durante el desarrollo del embarazo.

281 (287) NEO-VASCULARIZACIÓN DECIDUAL DURANTE LA ORGANOGÉNESIS MURINA: EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES KDR Y FLT-1 Y EFECTO DEL CONSUMO MATERNO DE ALCOHOL

Martín R Ventureira[1]; Cristian Sobarzo[2]; Vanina Vachetta[1]; Claudio Barbeito[3]; Elisa Cebral[1]
IFIBYNE-UBA/CONICET, FCEN[1] INBIOMED-UBA/CONICET, FMED[2] Lab. de Histología y Embriologñia, Fac. de Cs. Veterinarias, Univ. Nac. de La Plata[3]

La vascularización de la decidua, dependiente de la expresión del factor de crecimiento VEGF y sus receptores Flt-1 (R1) y KDR (R2), es un requisito indispensable para el establecimiento de la circulación placentaria durante la organogénesis temprana. Previamente, observamos que el consumo perigestacional de alcohol hasta el día 10 de gestación, produce oclusión de la luz vascular y reduce la expresión del factor de crecimiento VEGF en el área vascular de la decidua próxima a la interfase con el trofoblasto. El objetivo fue analizar: 1) la población de sitios de implantación (SI) con disminución de luz vascular decidual (H-E); 2) la calidad y proliferación endotelial (PAS e inmunohistoquímica (IHQ) de PCNA); 3) la remodelación muscular microarteriolar (IHQ actina); 4) la población de células uNK, su morfología (PAS, histoquímica lectina-DBA); 5) la expresión de los receptores R1 y R2 en endotelio y en uNK decidual (IHQ, IHQ-PAS). Se administró etanol al 10% en el agua de bebida, a hembras CF-1, por 15 días antes y hasta el día 10 de gestación (hembras tratadas, HT, vs hembras controles, HC). Las HT presentaron aumento de SI con luz vascular reducida (p<0,05, vs HC). Además de deficiente remodelación de la pared vascular, el índice proliferativo del endotelio vascular se redujo vs el de HC (0,24±0,05 vs 0,48±0,08, n=5, p<0,01). En los sitios de las HT, se encontró disminución de la población uNK (KDR-negativa, Flt-1-positiva) (p<0,05, vs HC), las que presentaron alteraciones morfológicas. En el tejido vascular y uNK de la decidua de las HT, la inmunoexpresión de KDR y Flt-1 fue menor, pero la activación de KDR (inmunoexpresión de la forma fosforilada), se incrementó en dichas áreas, vs. las HC (p<0,01). Estos resultados sugieren que el consumo perigestacional de alcohol hasta la organogénesis, conduce a vascularización decidual deficiente por cambios en la población de células uNK y desregulación del sistema de receptores de VEGF en el endotelio vascular.

282 (289) AUMENTO DE ESTRADIOL Y ACTIVACIÓN DE METALOPROTEINASA-2 EN UN MODELO DE ENDOMETRIOSIS MURINA KNOCK-OUT PARA EL RECEPTOR P55 DE TNFα

Federica Ghersa[12]; Sandra Vallcaneras[12]; Juan Ignacio Bastón[3]; Gabriela Meresman[3]; Marilina Casais[12]
Laboratorio de Biologia de la Reproducción y Radioisotopos[1] IMIBIO-SL[2] IBYME[3]

Endometriosis (EDT) es una enfermedad que afecta a las mujeres en edad reproductiva causando dolor e infertilidad con un cuadro de inflamación crónica. El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de la ausencia del receptor p55 para el factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) en el desarrollo de las lesiones endometriósicas en un modelo experimental. Trabajando con ratones C57BL/6 *knock-out* (KO) para el receptor p55 y *wild type* (WT) como control, se indujo la EDT quirúrgicamente. Brevemente, el cuerno uterino derecho fue dividido longitudinalmente y cortado en tres piezas que se suturan al mesenterio del intestino. A las 4 semanas, los ratones fueron sacrificados, se recolectó el fluido peritoneal (FP) para el dosaje de estradiol (E_2) por RIA y la determinación de la actividad enzimática de las metaloproteinasas-2 y -9 (MMP-2 y -9) mediante zimografía. Una lesión por animal fue preparada para la evaluación de la proliferación celular por inmunohistoquímica (IHQ) empleando un anticuerpo policlonal anti-PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular). El resto de las lesiones se conservaron a -80°C hasta el análisis de la expresión de p450aromatasa (p450arom) mediante *western blot* (WB). En los animales KO se observó un aumento en los niveles de E_2 (p<0,001) en FP, así como también un incremento significativo en la actividad de la enzima MMP-2 (p<0.001), mientras que MMP-9 solo mostro una tendencia al aumento. En las lesiones endometriosicas, la IHQ de PCNA reveló un aumento significativo en la proliferación celular (p<0,01) sin mostrar cambios en la expresión de p450arom en el grupo KO respecto del grupo WT. En conclusión, sugerimos que la ausencia del receptor p55 de TNF favorecería el crecimiento de la lesión, causada por una mayor tasa de proliferación celular. Así como también el aumento en los niveles de E_2 y la activación de MMPs contribuirían en conjunto al remodelado y establecimiento de las lesiones.

283 (300) EXPRESIÓN DE BMP 2, 4 Y 6 EN FOLÍCULOS OVÁRICOS DE BOVINOS CON PERSISTENCIA FOLICULAR INDUCIDA

Pablo Uriel Díaz; Cristian Jesus Leiva; Gustavo Hein; Natalia Carolina Gareis; Melisa Velázquez; Fernanda Rodríguez; Florencia Rey; Nattalia Salvetti; Hugo Ortega
Lab de Biología Celular y Molecular Aplicada ICIVET Litoral UNL CONICET

La persistencia folicular es causa de numerosos trastornos reproductivos en bovinos. En los folículos ováricos, las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) 2, 4 y 6 son expresadas en células de la granulosa (CG) y de la teca (CT). El objetivo fue estudiar la expresión de estas BMPs en ovarios de vacas con persistencia folicular inducida. Se realizó la sincronización de celos en 20 vacas, a 15 de las mismas se les colocó un dispositivo de liberación lenta de progesterona (P4) para lograr concentraciones subluteales de P4 y se tomaron muestras ováricas a los 5 (P5, n=5), 10 (P10,

n=5) y 15 (P15, n=15) días de persistencia a partir del momento esperado de la ovulación. Cinco animales controles fueron ovariectomizados en proestro (C). Sobre secciones de ovarios se determinó la expresión de las BMPs por inmunohistoquímica indirecta. En CG, la expresión de BMP2 en folículos preantrales pequeños fue mayor en P5 en relación a los grupos restantes ($p<0.05$). Los folículos persistentes de P5, P10 y P15 mostraron mayor expresión para BMP2 que los folículos antrales del grupo C. En CT los folículos preantrales y atrésicos de C mostraron mayor expresión que los del grupo P15 ($p<0.05$). La expresión de BMP4 en CG fue mayor en las distintas categorías foliculares de P5 y P10 en relación a los grupos C y P15 ($p<0.05$). La teca del grupo P10 presentó mayor expresión en todas las categorías foliculares con respecto a los grupos restantes ($p<0.05$). Tanto CG como CT mostraron mayor marcación en los folículos persistentes de P10 que los antrales del grupo C ($p<0.05$). La expresión de BMP6 en CG fue mayor en todas las categorías foliculares del grupo P15 en relación a los controles ($p<0.05$). En CT los folículos antrales de los grupos tratados presentaron mayor expresión que los C ($p<0.05$). Estos resultados sugieren un importante rol de las BMPs en los mecanismos que llevan a la persistencia de los folículos dominantes e intervienen desde el inicio en los cambios ováricos.

284 (309) CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO REPRODUCTIVO DE RATONES DOBLE KNOCKOUT PARA CRISP2 Y CRISP4

Nicolás Gastón Brukman[1]; Guillermo Carvajal[1]; Pablo Torres[2]; Julio Javier Caramelo[3]; Daniel Lombardo[2]; Vanina Gabriela Da Ros[1]; Patricia Sara Cuasnicu[1]
IBYME-CONICET[1] INITRA-FVet-UBA[2] Fundación Instituto Leloir[3]

Los cuatros miembros de la familia CRISP (*Cysteine-Rich Secretory Proteins*) (CRISP1-4) se expresan mayoritariamente en el tracto reproductor masculino de mamíferos, se encuentran presentes en el espermatozoide y participan en el proceso de fertilización. A pesar de la relevancia funcional de las CRISP, los animales *knockout* (KO) para CRISP1, CRISP2 y CRISP4 resultaron fértiles, indicando la existencia de mecanismos compensatorios entre dichas proteínas. En base a ello, nos planteamos como objetivo estudiar el fenotipo reproductivo de animales deficientes en más de una proteína CRISP simultáneamente. En este trabajo, se generó una colonia doble KO (KO/KO) para los genes *crisp2* y *crisp4* por medio de cruzas entre las colonias KO individuales. La fertilidad de los machos KO/KO fue evaluada por apareo natural y no fue significativamente diferente a la de los machos control (WT/WT). Sin embargo, en los ensayos de fertilización *in vitro,* los espermatozoides KO/KO lograron fertilizar un número significativamente menor de ovocitos que los WT/WT. Posteriormente, se estudiaron *in vitro* diferentes parámetros espermáticos asociados al proceso de capacitación, evidenciándose alteraciones en la fosforilación de proteínas en residuos tirosina, las cuales no habian sido observadas en las colonias individuales, como así también en los porcentajes de reacción acrosomal inducida por progesterona e hiperactividad. Finalmente, se observó que la ausencia de CRISP2 en los espermatozoides KO para esta proteína produjo una desregulación en el calcio citosólico durante la capacitación, resultado consistente con las alteraciones antes mencionadas dada la calcio-dependencia de los eventos asociados al proceso de capacitación. En conjunto, nuestras observaciones apoyan la existencia de una cooperación entre las proteínas CRISP2 y CRISP4 en la regulación de la función espermática con el fin de asegurar el éxito de la fertilización.

285 (311) PROLACTINA CORRELACIONA NEGATIVAMENTE CON SU RECEPTOR OVÁRICO HACIA EL FINAL DE LA GESTACIÓN DE LAGOSTOMUS MAXIMUS (RODENTIA: CHINCHILLIDAE)

Sofia Proietto[1]; Clara Corso[1]; Alejandro Schmidt[12]; Santiago Elias Charif[12]; Pablo Ignacio Felipe Inserra[12]; Alfredo Daniel Vitullo[12]; Veronica Berta Dorfman[12]; Julia Halperin[12]
CEBBAD,Universidad Maimónides[1] CONICET[2]

Prolactina (PRL) estimula la producción de progesterona (Pg) del cuerpo lúteo la cual tiene un efecto de feedback positivo sobre la expresión de hormona luteinizante (LH). Por otra parte, la Pg es esencial para sostener exitosamente la gestación y su caída abrupta hacia el final de la preñez gatilla el parto. Teniendo en cuenta que *Lagostomus maximus* presenta un evento ovulatorio a mitad de una larga preñez de 155 días, atípica para un roedor, se analizaron las expresiones, a nivel proteico y de ARNm, de PRL y LH hipofisarias, de los receptores ováricos de PRL, LH y Pg (PRL-R, LH-R, Pg-R) y los niveles séricos de Pg y LH por ELISA en hembras no preñadas (NP), NP ovulando (NPO), preñadas tempranas (PTemp), medias (Pmed), a término (PTer) y NP lactando (NPLact). Los niveles de Pg circulantes fueron significativamente más altos en los grupos que estaban ovulando (NPO y Pmed) y cayeron abruptamente al final de la preñez (Pter) (ANOVA, n=6/grupo, $p<0.05$). Como era de esperar, tanto los niveles séricos de LH como los niveles de expresión de LH-R ováricos se mostraron incrementados en estos mismos grupos, acompañando el perfil de Pg. En cuanto a la PRL, si bien el análisis del contenido hipofisario mostró un incremento significativo al final de la preñez y durante la lactancia (ANOVA, n=6/grupo, $p<0.05$), la expresión de PRL-R en ovario disminuyó significativamente tanto en hembras Pter como en NPLact ($IC_{PRLhipof\text{-}PRLRovar}$= -0.87, $p<0.05$). Altos niveles de PRL hipofisaria hacia el final de la gestación y durante la lactancia son condición necesaria para estimular la producción de leche en glándula maMaría para el cuidado de las crías. No obstante, la inhibición del PRL-R ovárico hacia el final de la gestación obliteraría el efecto estimulador de PRL sobre la producción de Pg luteal favoreciendo su disminución al momento del parto. PIP0272 CONICET-Fundación Científica Felipe Fiorellino

286 (331) EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES DE LÍNEA GERMINAL IFITM3 Y DDX4 EN CARCINOMA DE CÉLULAS CLARAS Y ENDOMETROIDE

Nicolas Fraunhoffer[123]; Analia Meilerman Abuelafia[13]; Ines Stella[3]; Silvia Galliano[34]; Marcela Barrios[3]; Pablo Lopez Bergami[12]; Alfredo Vitullo[12]
Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnóstico[1] Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas-CONICET[2] Carrera de Medicina-Universidad Maimónides[3] Servicio de Anatomía Patológica-Hospital Eva Perón de Merlo[4]

El cáncer epitelial ovárico es la cuarta causa de muerte por cáncer en mujeres en el mundo. Análisis epidemiológicos demostraron la relación entre la endometriosis y carcinoma de células claras y endometroide, pero los mecanismos celulares asociados a la evolución de esta patología hacia la malignidad no fueron dilucidados. Estudios realizados por nuestro laboratorio demostraron, en la lesión endometrial ovárica, la existencia de células que expresan los marcadores IFITM3 y DDX4, característicos de células madre ováricas (CMO) que podrían provenir del epitelio de superficie o la túnica albugínea. En el presente trabajo se analizó la expresión de marcadores de línea germinal en carcinomas de células claras y endometroide y su relación con la célula madre tumoral (CMT). Se evaluaron un total de 10 carcinomas de ovario (6 de células claras y 4 endometroides) y 16 tumores benignos (8 teratomas, 4 mucinosos y 4 seroso-papilares). Las muestras incluidas en parafina fueron obtenidas del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Eva Perón de Merlo. Mediante IHQ e IF se estudió el receptor corto de interferón, IFITM3; el marcador de línea germinal, DDX4 y los marcadores de CMT, OCT4 y CD133. Se detectó intensa inmunomarcación para IFITM3 en todas las muestras de tumores malignos en estudio a nivel de la membrana plasmática, siendo de localización apical en el carcinoma endometroide. DDX4 presentó intensa marca en el carcinoma de células claras, mientras que en el carcinoma endometroide se detectó en un número reducido de células. En ambos tipos de carcinoma, IFITM3 y DDX4 co-localizaron en células CD133 y OCT4 positivas. La identificación de CMT $CD133^+/OCT4^+$ que expresan DDX4 e IFITM3 sugiere la participación de CMO en el desarrollo de la patología tumoral maligna. En este contexto, la presencia de CMO DDX4/IFITM3 positivas previamente descripta

en la endometriosis ovárica podrían indicar su participación en la evolución de la endometriosis hacia la malignidad.

287 (334) IMPLICANCIAS DE LOS LIPIDS RAFTS EN LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN PLACENTA HUMANA

Cyntia Aban[1]; Nora Martinez[4]; Gustavo Leguizamón[2]; Denise Trigubo[2]; Vanesa Herlax[3]; Sabrina Maté[3]; Ana Franchi[1]; Alicia Damiano[4]; Maríana Farina[1]
CEFYBO[1] CEMIC (CTRO. de Educacion Medica E Inv. clinica)[2] INIBIOLP[3] IFIBIO Houssay[4]

El sincitiotrofoblasto constituye la principal barrera de intercambio materno-fetal. Esta membrana se polariza formando dos dominios: basal y apical. Ambas expresan lipid rafts (LR) microdominios de membrana que forman una matriz estable para la señalización mediada por receptor.La placenta produce anandamida (AEA), un mediador lipídico endógeno (endocannabinoide) que ejerce su acción a través de la unión a los receptores cannabinoides (CBs), o vanilloide tipo 1 TRPV-1. La AEA puede modular la síntesis de óxido nítrico (NO). Los LR pueden regular la unión y señalización del receptor CB1.Nuestro objetivo fue evaluar la participación de los LR en la regulación diferencial de AEA sobre la producción de NO en placenta humana.Utilizamos vellosidades placentarias de cesáreas electivas (STP) o partos vaginales (CTP) a término. No detectamos diferencias en la actividad basal de la óxido nítrico sintasa (NOS) en placentas STP y CTP (técnica de Bredt & Snyder). La AEA causó un efecto dual sobre la actividad de la NOS, dado que estimuló ($p<0,001$) en placentas STP mientras que inhibió la producción de NO en placentas CTP ($p<0,01$). Este efecto fue revertido por la co-incubación con un antagonista del receptor CB1 (AM251), mientras que no se modificó con capsazepina, antagonista del receptor TRPV-1.Se analizó flotilina (marcador de LR) y caveolina1 (integrante de caveolas) en membranas resistentes a detergentes (DRMs) obtenidas por ultracentrifugación. Por western blot detectamos que CB1 transloca a la membrana basal en placentas CTP; mientras que eNOS se detecta en la membrana apical co-localizando con flotilina y caveolina1.Concluimos que, en placentas STP AEA ejerce un efecto estimulatorio sobre la actividad de la NOS vía CB1, mientras que cuando se desencadena el parto a término tendría un efecto inhibitorio sobre la producción de NO que involucra la participación de los LR.

288 (336) ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS DE DETOXIFICACIÓN EN EL INTESTINO DE LA DESCENDENCIA DE RATA ALIMENTADA CON UNA SOBRECARGA DE GRASAS SATURADAS

María Belén Mazzucco; Sabrina Roberti; Romina Higa; Alicia Jawerbaum; Verónica White
CEFYBO

De manera previa evidenciamos alteraciones metabólicas plasmáticas y anomalías en la expresión de incretinas en el intestino de fetos y de la descendencia de rata alimentada con una sobrecarga de grasas saturadas en la dieta. Las MRP (proteína asociada a resistencia a multidrogas) 2 y 3 son clave en la detoxificación intestinal y del organismo, estrechamente vinculada con la capacidad antioxidante. Objetivo: Investigar si la sobrecarga de grasas saturadas en la dieta materna de rata induce alteraciones en la peroxidación lipídica y producción de óxido nítrico (NO), parámetros vinculados al estrés oxidativo y nitrativo, y en la expresión de MRP2 y MRP3 en el intestino de fetos y crías de rata. Métodos: Ratas Wistar de 6 semanas se alimentaron con dieta estándar (grupo control) o con un 25% de incremento en grasas saturadas (grupo DGS). Todas las ratas se aparearon con machos sanos. Se obtuvo el intestino de fetos de 21 días de gestación y de la cría de 21 y 140 días de edad. Se dosó la concentración de nitratos y nitritos a través de la técnica de Griess como índice de la producción de NO y la peroxidación lipídica a través del dosaje de TBARS. La expresión génica de MRP 2 y 3 se analizó por RT-PCR. Resultados: Se encontró un incremento en la peroxidación lipídica en el intestino de la cría de 21 (44%) y 140 (70%) días ($p<0.05$) del grupo DGS en relación al control. Más aún, la producción de NO se encontró incrementada en fetos (45%) y crías de 21 (45%) y 140 días (60%) ($p<0.05$) del grupo DGS. La expresión intestinal de MRP2 se encontró disminuida en los fetos (30%) y crías de 140 días (40%) y la expresión de MRP3 se encontró disminuida crías de 21 días (20%) ($p<0.05$) de ratas DGS con respecto al control. Conclusión: El incremento de grasas saturadas en la dieta materna induce un entorno pro-oxidante y alteraciones en MRPs, lo que sugiere una programación de alteraciones en la función de detoxificación intestinal en la descendencia de rata.

289 (351) LA PROTEÍNA CRISP1 DEL CÚMULUS COMO MODULADORA DE LA ORIENTACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE A TRAVÉS DE SU CAPACIDAD DE REGULAR CANALES DE CALCIO

Ludmila Curci[1]; Maríana Weigel Muñoz[1]; María A. Battistone[1]; Gerardo Orta[2]; Dulce Figueiras-Fierro[2]; José L. De La Vega-Beltran[2]; Alberto Darszon[2]; Débora J. Cohen[1]; Patricia S. Cuasnicú[1]
IBYME[1] Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México.[2]

Recientes estudios de nuestro grupo indican que la proteína CRISP1 (Cysteine Rich Secretory Protein 1) presente en el espermatozoide se expresa también en las células del cúmulus que rodean al ovocito y cumple un rol quimioatractante de espermatozoides inhibiendo la hiperactividad de los mismos durante la fertilización. Dado que la hiperactividad está regulada por CatSper, el principal canal de calcio del espermatozoide esencial para la fertilidad masculina, investigamos la capacidad de de CRISP1 de regular dicho canal. Mediante la técnica de medición del potencial de membrana en presencia de EGTA se observó que tanto los inhibidores específicos de CatSper (NNC, Ni^{2+} y HC) como CRISP1 nativa, pero no CRISP1 desnaturalizada, inhibieron la depolarización de la membrana indicando una disminución en las corrientes que pasan a través del canal. Con el fin de investigar si la actividad quimioatractante de CRISP1 esta mediada por su capacidad de inhibir CatSper, se evaluó la capacidad qumioatratante de un antagonista (NNC) y de un agonista (4-AP) del canal. Mientras que el NNC fue capaz de quimioatraer a los espermatozoides al igual que CRISP1, el 4-AP no tuvo actividad, sugiriendo que la qumioatracción inducida por CRISP1 se encontraría mediada por la inhibición de CatSper. Finalmente, investigamos la participación de CRISP1 del cúmulus en el proceso de fertilización in vivo por apareo de machos control con hembras knockout para CRISP1 superovuladas, observando una bajada significativa en el porcentaje de ovocitos fertilizados en el oviducto respecto al control. En conjunto, estos resultados apoyan la existencia de un mecanismo de regulación fina de la orientación de los espermatozoides mediado por la capacidad de CRISP1 de regular CatSper durante la fertilización con importantes implicancias para la fertilidad y la anticoncepción.

FARMACOLOGÍA 2

290 (49) FÁRMACOS PARA EL SISTEMA CARDIOVASCULAR POTENCIALMENTE INAPROPIADOS PARA USO EN ADULTOS MAYORES

Marta M Marzi; Miryam S Pires; Nora B Quaglia
Facultad de Ciencias BioQuímicas y Farmaceuticas. Universidad Nacional de Rosario

Como resultado de estudios previos se desarrolló una lista preliminar conteniendo medicamentos que se comercializan en Argentina y son considerados potencialmente inapropiados (PI) para uso en adultos mayores (lista PIM_p). En este trabajo se propuso someter a evaluación de un panel de expertos, fármacos para el Sistema Cardiovascular (SC) según relación seguridad/efectividad en el adulto mayor. Se aplicó el método Delphi constituyendo un panel de diez especialistas en el tema y se propusieron los fármacos para el SC de la lista PIM_p. La encuesta de la 1° ronda consistió en valorar dichos fármacos según una escala Likert con 5 categorías de respuestas. Los ítems en los que no se logró el consenso de los panelistas fueron reevaluados en rondas su-

cesivas. Finalizadas dos rondas Delphi fueron valorados como PI: quinidina, propafenona, flecainida, amiodarona, metildopa, clonidina, rilmenidina, doxazosina, isoxsuprina, pentoxifilina, dihidroergotoxina, nicergolina, dihidroergocristina, sotalol, nifedipina, digoxina. Los principales efectos adversos mencionados fueron: prolongación del intervalo QT, fibrilación ventricular, muerte súbita (antiarrítmicos y sotalol); hipotensión, bradicardia, sedación, síncope (antiadrenérgicos de acción central); hipertensión, glaucoma, disfunción hepática y renal (vasodilatadores); infarto de miocardio (nifedipina de acción corta); riesgo de sobredosis en pacientes con insuficiencia renal (digoxina). Se propusieron alternativas terapéuticas más seguras para algunos y recomendaciones y precauciones de uso para otros. Logrado el consenso de los expertos en 16 fármacos PI para el SC, en próximos trabajos serán evaluados agentes que actúan sobre otros órganos y sistemas. Contar con una lista PIM definitiva consensuada por expertos de nuestro país es fundamental para optimizar la prescripción y mejorar la calidad de vida de los adultos mayores.

291 (83) PRODUCCIÓN DE UN NUEVO AGENTE TERAPÉUTICO BASADO EN LA HIPERGLICOSILACIÓN DE HIFN-2B EMPLEANDO HUÉSPEDES CELULARES DERIVADOS DE MAMÍFEROS

Agustina Gugliotta; Brenda Raud; Marcos Oggero Eberhardt; Marina Etcheverrigaray; Ricardo Kratje; Natalia Ceaglio
Laboratorio de Cultivos Celulares Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas Universidad Nacional del Litoral

El interferón alfa humano recombinante (rhIFN-α) producido en bacterias es ampliamente utilizado como agente terapéutico para el tratamiento de diferentes enfermedades virales y tumorales. Sin embargo, sus características fisicoquímicas determinan la necesidad de su administración en dosis elevadas y frecuentes para alcanzar la ventana terapéutica. Para mejorar sus propiedades farmacocinéticas, se produjo una variante hiperglicosilada del hIFN-2b (IFN4N) que posee 4 sitios ocupados por *N*-glicanos y que se caracteriza por presentar una masa molecular y densidad de carga superiores al hIFN-α2b no glicosilado. La abundante presencia de glúcidos unidos al IFN4N permitió mejorar notablemente sus propiedades farmacocinéticas, lo cual se tradujo en una mejora de su actividad antitumoral *in vivo* en ratones. Dado que el IFN4N producido en células de hámster (CHO-K1) exhibió estructuras glicosídicas antigénicas para humanos que pueden afectar su desempeño como agente terapéutico, se seleccionaron las células humanas HEK 293 para comparar la calidad de la glicoproteína producida. De este modo, el $IFN4N_{CHO}$ presentó una masa molecular y contenido de ácido siálico superiores al $IFN4N_{HEK}$, confirmándose además la presencia de estructuras antigénicas. El análisis de glicanos cargados evidenció mayor contenido de estructuras neutras para el $IFN4N_{HEK}$ mientras que predominaron las estructuras cargadas para el $IFN4N_{CHO}$. Los ensayos de actividad biológica antiproliferativa *in vitro* demostraron mayor actividad biológica específica para la variante $FN4N_{HEK}$, mientras que estudios de farmacocinética revelaron mejores propiedades para la variante $IFN4N_{CHO}$. En conclusión, una misma modificación postraduccional como la glicosilación generó propiedades diferentes a pesar de expresar la misma molécula en huéspedes derivados de mamíferos. Finalmente, la selección del mejor candidato terapéutico requerirá de posteriores ensayos biológicos a realizarse *in vivo*.

292 (88) EFECTO COMBINADO DE UNA FITOLECTINA DE UNIÓN A MANOSA Y FLUCONAZOL SOBRE EL CRECIMIENTO DE CANDIDA

Maríanela Victoria Del Rio[1]; Maríana Regente[1]; Érica Mello[2]; Suzzana Ribeiro[2]; Marcela Pinedo[1]; Gabriel Taveira[2]; Melanie Genoula[1]; Valdirene Gomes[2]; Laura De La Canal[1]
Instituto de Investigaciones Biológicas UNMdP-CONICET[1]
Centro de Biociéncias e Biotecnología-Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro[2]

Las lectinas son proteínas con capacidad de unión selectiva a carbohidratos, lo que ha permitido el desarrollo de múltiples aplicaciones en biomedicina, entre ellas, la detección específica de moléculas glicosiladas en la superficie de agentes patógenos. En nuestro laboratorio aislamos una lectina de girasol de unión a manosa (Helja) con actividad anti-*Candida* que modifica la permeabilidad de la membrana celular y estimula la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de Helja en combinación con fluconazol (FLCZ) para evaluar su potencial aplicación en el diseño de alternativas farmacológicas de mayor eficiencia frente a *Candida.* Se realizaron ensayos de actividad antifúngica monitoreando el crecimiento de *C. albicans* y *C. parapsilosis* en presencia de Helja y FLCZ en dosis inferiores al IC50. Dado que FLCZ produce disrupción de la membrana plasmática, vía inhibición de la síntesis de ergosterol y Helja mostró previamente capacidad de permeabilización celular, se esperaba que la combinación de ambos potenciara la actividad antifúngica. Sin embargo, Helja en una dosis de 50 µg/ml redujo la actividad de FLCZ en un 90,7% sobre *C. albicans* y 46% sobre *C. parapsilosis*. El tratamiento con Helja en ausencia y presencia de FLCZ indujo además modificaciones en la morfología celular para ambas especies, evidenciadas por la detección de abundantes pseudohifas. La combinación de Helja y FLCZ mostró un efecto atenuado de la actividad anti-*Candida*, mientras que la inducción de cambios morfológicos junto a la detección de ROS observada previamente sugiere que Helja sola o combinada con FLCZ desencadena mecanismos de respuesta por parte del microorganismo. Los resultados obtenidos estimulan a estudiar las bases moleculares del antagonismo entre Helja y FLCZ y su efecto en el mecanismo de infección de *Candida* sobre células hospedadoras.

293 (103) ARTÍCULOS DE REVISIÓN DE EFECTOS ADVERSOS EN LA PRÁCTICA CLÍNICA PUBLICADOS EN ESPAÑOL: IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN

Marta M Marzi; Darío Weitz; Aylén Avila; Gabriel Molina; Laura Piskulic; María Belén Allasia; Lucía Caraballo; Fernando Díaz Pacífico; Nora B Quaglia
Facultad de Ciencias BioQuímicas y Farmaceuticas. Universidad Nacional de Rosario

La toma de decisiones en medicina requiere de un adecuado criterio clínico sustentado en experiencia personal y lectura metódica y crítica de bibliografía científica actualizada. Interesó indagar si un profesional de la salud puede recuperar de fuentes electrónicas, estudios de revisión que evalúen efectos adversos (EA) en la práctica clínica, publicados en español y realizados con metodología que minimice los sesgos. Se realizó una búsqueda en MEDLINE, BVS y DARE utilizando estrategias que incluían términos afines a “efecto adverso” y “revisión”, para el período 2010-2014 e idioma español. De los artículos recuperados se registraron características relevantes, se calcularon frecuencias y se analizó homogeneidad (prueba Chi-cuadrado). Resultaron identificadas 521 citas (MEDLINE:260, BVS:24, DARE:237) de las cuales 225 de DARE fueron inicialmente excluidas porque el artículo no estaba en español (DARE no permite filtrar por idioma). Finalizada la selección quedaron 62 revisiones narrativas (RN) y 29 revisiones sistemáticas/metaanálisis (RN/MA). En el 76,9% de las revisiones, estudiar los EA no fue el principal objetivo y en el 68,1% la intervención fue farmacológica. El 53,8% de RN fue realizada por un máximo de tres autores mientras que el 65,5% de RS/MA requirieron cuatro o más (p=0,0371). La palabra “Revisión” en el título, que facilita la identificación en las bases de datos, fue empleada en 16,1% de RN y en 89,6% de RS/MA (p<0,0001). Se considera insuficiente el número de revisiones de EA recuperadas en español. Dado que las RS/MA, al estar elaboradas con rigor metodológico, aportan evidencia confiable para la toma de decisiones en la práctica clínica, su escaso número no favorece la actualización de los profesionales de habla hispana que quieren informarse en su lengua de origen. Hay una tendencia creciente en asociar excelencia con lengua inglesa, lo que resulta en una disminución de publicaciones en español. Desde las instituciones habría que impulsar la difusión de la ciencia en español.

294 (146) SURFACTANTE PULMONAR EXOGENO COMO CAR- RIER DE GLUCOCORTICOIDES: ANALISIS DE LA ESTRUCTURA Y LA ACTIVIDAD TENSIOACTIVA

Alejandra Cimato[1]; Andres Hoyos Obando[1]; Jessica Martinelli[1]; Graciela Facorro[2]; María Margarita Martínez Sarrasague[1]
Fac. de Farmacia y Bioquímica[1] Inst. Univ. Hosp. Italiano Bs.as.[2]

Introducción: El surfactante pulmonar (SP) puede usarse como *carrier* de glucocorticoides (GC) en terapias de patologías respiratorias. Los GC liberados en las vías aéreas no deben interferir con la actividad del surfactante. En trabajos previos hemos encontrado que el colesterol (Col) cambia la estructura del surfactante, alterando su capacidad tensioactiva. Se podría pensar que los GC, con estructura similar al Col podrían tener estos mismos efectos sobre el SP. Se analizó el efecto de Budesonide (Bude), Beclometasona (Beclo) y Fluticasona (Fluti) sobre la estructura y la actividad de un SP exógeno (SPE) bovino. Métodos: SPE (PL=10mg/ml) solo o adicionado con cada GC (1 mg/ml) o Col, fue marcado con ácido 5 y16 – DE, para su estudio por espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (ESR). El parámetro de orden (S), el tiempo de correlación (T_C) y la relación S/W se calcularon a partir de los espectros obtenidos, para evaluar los cambios conformacionales y de fluidez. Las fracciones pesada (activa) y liviana (inactiva) del SPE se obtuvieron por centrifugación (12000rpm) y la proporción entre ellas se evaluó mediante determinación de PL. Los GC incorporados en cada fracción se determinaron por absorción al UV. La capacidad tensioactiva se midió con un surfactómetro de burbuja pulsátil. Resultados: Beclo y Fluti sólo se incorporaron a la fracción activa pesada del SPE, mientras que el Bude lo hizo en igual proporción en ambas fracciones. Bude y Becla aumentaron el S y la tensión superficial ($p<0.05$) pero menos que el Col. Fluti y Beclo aumentaron la relación S/W ($p<0.01$). No se evidenciaron cambios significativos ni en el T_C ni en la proporción de las fracciones del SPE. Solo las muestras con Col no tuvieron apropiada tensioactividad. Conclusiones: Excepto la Fluti, los otros GC y el Col alteran la estructura del SPE en la región polar. La disminución de la fluidez de esta región correlaciona con el aumento de la tensión superficial.

295 (156) MONITOREO TERAPÉUTICO DE MIDAZOLAM DES- PUÉS DE SER ADMINISTRADA IV O INTRANASAL UTILIZANDO UN MODELO INFORMÁTICO SIMULADO E ÍNDICE BIESPECTRAL (BIS)

María Cecilia Kravetz[1]; Esteban Otamendi[12]; Damián Cuadrado[1]; Alberto Lazarowski[12]; Fabian Buontempo[1]; Diego A. Chiappetta[1]; Juan José Capria[2]; Guillermo F. Bramuglia[12]
Facultad de Farmacia y BioQuímica, UBA[1] Fundación Investigar[2]

Introducción: El midazolam (MDZ) se utiliza en anestesia intravenosa para la inducción de la hipnosis. Sin embargo una gran variabilida inter-individual se observa en la respuesta farmacológica. El índice biespectral (BIS) es un parámetro que deriva de cambios en el perfil electroencefalográfico y proporciona una medida más objetiva del nivel de sedación para el desarrollo de modelos PK/PD. Objetivo: Evaluar mediante un modelo farmacocinético poblacional la concentración de MDZ y su relación con la respuesta farmacológica mediante la determinación del BIS. Materiales y Métodos: Los voluntarios que previamente firmaron un consentimiento informado, recibieron 3 mg de MDZ IV. La concentración de MDZ fue simulada utilizando el modelo farmacocinético de Greenblatt. Se tomó una muestra de sangre cuando se alcanzó el equilibrio entre la sangre (Cp) y el compartimiento de efecto (Ce) en el modelo simulado. Una dosis intranasal (IN) de 3 mg fue administrada a los mismos voluntarios luego de una semana de wash-out. Se registró BIS, frecuencia cardíaca, y saturación de oxígeno. Resultados: Luego de la administración IV se observaron tres niveles de BIS: entre 100 a 80 (n = 1), 79-60 (n = 3), inferior a 59 (n = 1). El mismo patrón se observó en ambas administraciones, aunque luego de la administración IN la disminución del BIS se verificó a tiempos más largos. Se observó una concordancia entre la Cp medido y simulado (mediana Cpm: 34,27ng / ml; Cps: 36, 44ng / ml). Conclusión: Las variables demograficas utilizadas por el modelo farmacocinético poblacional (Greenblat) no explicaron las diferencias en la respuesta farmacológica de MDZ. Otras variables farmacocinéticas (por ej diferencias inter-individuales en el metabolismo de MDZ), o farmacodinámicas (por ej interacción droga-receptor) deberían ser estudiadas para caracterizar su farmacocinética o farmacodinámica con el fin de individualizar regímenes de dosis en pacientes que reciben anestesia intravenosa.

296 (163) NUEVAS ESTRATEGIAS PARA EL TRATAMIENTO DEL DOLOR: POTENCIACIÓN DEL EFECTO ANALGÉSICO Y MODIFICACIÓN DE LA TOLERANCIA DE METADONA POR LOS ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 EN RATAS

Carlos Laino;María Eugenia Toledo; Nahuel Rafael Maresca
Instituto de Biotecnologia- Univ.Nac. de la Rioja

El tratamiento del dolor severo agudo y crónico sigue siendo un importante desafío y frecuente en la clínica médica. La metadona constituye una excelente alternativa a la morfina, aunque sus efectos adversos y el desarrollo de la tolerancia al efecto analgésico son las mayores complicaciones durante el tratamiento crónico, limitando la utilidad de la metadona en el tratamiento del dolor. Recientes evidencias han asociado a los ácidos grasos omega-3 (AG -3) con la reducción del dolor. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto analgésico y la variación de peso que produce metadona por los tratamientos combinados con los AG -3 en ratas. Los animales fueron tratados por 16 días con AG -3 y con metadona en tratamiento agudo y tambien en tratamiento combinado por 16 días, utilizando el hot plate test para evaluar el efecto analgésico. Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento crónico con los AG-3, aumentó significativamente la latencia de la respuesta analgésica en comparación con el grupo control. Metadona agudo después del tratamiento con AG -3 produjo un efecto sinérgico analgésico, mayor que los tratamientos individuales. Además, el tratamiento crónico y combinado de metadona con AG -3, anuló la tolerancia del efecto analgésico, y también disminuyo la pérdida de peso que produce metadona. Nuestros resultados sugieren que el efecto analgésico aditivo, la anulación de la tolerancia y disminucion de la pérdida de peso de este opioide por este cotratamiento de metadona y AG -3,podrían representar una nueva estrategia de tratamiento del dolor severo agudo y crónico para reducir la aparición de los efectos adversos que se desarrollan con el uso de metadona.

297 (182) ESTUDIOS DE TOXICIDAD ORAL AGUDA Y SUBCRÓNICA, EN ROEDORES, DE OVIDIA ANDINA (THYMELAEACEA), ESPECIE CON POTENCIAL EFECTO INSECTICIDA

Jorge H. Miño[1]; Verónica P. Tarcaya[2]; Ingrid Cufre[2]; Adriana M. Broussalis[2]
Univ. del Salvador Fac. de Medicina[1] UBA-Facultad de Farmacia y Bioquímica[2]

Ovidia andina (Poeppig) Meisnner (Thyrnelaeacea) es una especie nativa del sur de Argentina y Chile. En Argentina se encuentra en el bosque andino patagónico, desde el centro de Neuquén hasta el norte de Chubut. El extracto cloruro de metileno (CM) de *O. andina* presentó actividad insecticida en varios modelos experimentales. El presente estudio evaluó la toxicidad potencial de esta especie luego de la administración aguda y subcrónica en roedores. En estudios de toxicidad aguda, ratones Swiss fueron administrados por vía oral con el extracto CM de *O.andina* a la dosis de 5 g/kg (ensayo límite) y fueron observados durante 15 días para detectar posibles cambios conductuales y mortalidad. En estudios de toxicidad subcrónica,ratas Wistar fueron administrados a una dosis de 100 mg/kg p.o. durante 28 días y se observaron para evaluar cambios en el comportamiento mediante tests conductuales, peso corporal e ingesta diaria de alimento. Luego de 28 días,se practicaron estudios hematológi-

cos (Recuento de rojos, hemoglobina, hematocrito, recuento de plaquetas y de glóbulos blancos) y bioquímicos (Glucosa, colesterol, triglicéridos, bilirrubina, ALT, AST, urea, creatinina). En los estudios de toxicidad aguda no se observó mortalidad o comportamiento anormal, con el extracto de *O.andina*. En el estudio de toxicidad sub-crónica no se observaron cambios significativos en el peso corporal e ingesta de alimento en comparación con los animales tratados con vehículo. Los parámetros hematológicos y bioquímicos medidos no mostraron diferencias significativas con los controles (P>0.05 ANOVA). El extracto cloruro de metileno de *O. andina* no presenta toxicidad oral aguda o subcrónica en roedores. Estas características permitirían considerar el extracto para el desarrollo futuro de ingredientes de formulaciones insecticidas, seguros para la salud y el medio ambiente. Agradecimientos: Este trabajo fue financiado con fondos de los proyectos UBACYT 20020110200361 y 20020130100705BA

298 (201) DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE IMIPENEM EN LAVADO BRONCOALVEOLAR EN PACIENTES CON ASISTENCIA RESPIRATORIA MECÁNICA

Ventura Simonovich; Maríana Mendez; Marcos Las Heras; María Laura Perez; Matias Soifer; Marisa Sanchez; Paula Scibona; María Isabel Gimenez; Waldo Belloso
Hospital Italiano De Buenos Aires

Introducción: La biofase en las neumonías es el fluido del epitelio respiratorio. No hay evidencia acerca de la concentración que alcanza el imipenem en dicho compartimiento en pacientes críticos. El motivo por el cual creemos no se ha podido conseguir este dato, es por la inestabilidad del imipenem. Hemos diseñado un estudio piloto para evaluar la concentración en el líquido epitelial respiratorio de imipenem en pacientes bajo asistencia respiratoria mecánica en la unidad de cuidados intensivos, acelerando los procesos de toma de muestra y procesamiento de las mismas. Este estudio fue aprobado por el Comité de Etica de Protocolos de Investigación del Hospital Italiano de Buenos Aires. Objetivo En esta primera etapa el objetivo es dosar al imipenem en fluídos respiratorios y establecer la relación con la concentración plasmática Métodos: Se realizaron dos lavados bronco alveolares (BAL) y dosajes sanguíneos en pacientes internados con sospecha de neumonía. Cuantificamos imipenem en las muestras de BAL y plasma por cromatografía líquida y espectrometría de masa (LC-MS/MS). Las muestras de BAL fueron tomadas utilizando una solución de dextrosa 5%. Para el método de masas se empleó MRM con 2 transiciones (300.1>142.0 y 300.1>126.0). El límite inferior de cuantificación en plasma fue 0.3 µg/mL y en BAL 0.3 ng/mL. Resultados: Fueron incluídos 4 pacientes de sexo masculino incluidos; edad media: 59,75. Todos habían recibido 500 miligramos cada 6 horas. La mediana de concentración en BAL fue de 1,7 ng, en sangre la mediana de la concentración fue de 5201,15 ng. Conclusiones: Las dificultades para dosar el imipenem tuvieron relación con la toma de muestra con solución fisiológica. Al cambiar el lavado por Dextrosa al 5% se logro dosar, sin embargo las dosis encontradas fueron muy bajas. Los valores hallados en plasma estuvieron todos por encima de la concentracion inhibitoria minima para el germen detectado.

299 (245) EL ZILEUTÓN (ZI), INHIBIDOR DE LA 5-LIPOOXIGENASA (5-LO), REDUCE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA A LAS 24 HORAS POST-HEPATECTOMÍA PARCIAL (HP)

Florencia Lorenzetti[1]; Alejo Matías Capiglioni[1]; Juan Pablo Parody[1]; María Paula Ceballos[1]; Juan Alberto Monti[1]; Gerardo Bruno Pisani[2]; María Teresa Ronco[1]; Cristina Ester Carnovale[1]; María Cristina Carrillo[12]; Ariel Darío Quiroga[12]; María De Luján Alvarez[12]
IFISE[1] Área Morfología (FBioyF, UNR)[2]

Los leucotrienos (LTs) son eicosanoides inflamatorios derivados del ácido araquidónico a través de la vía de la 5-LO. Los principales LTs son LTB4 y LTC4, que además participan en proliferación celular. El hígado juega un rol central en la producción y metabolismo de LTs y se publicó que la inhibición de 5-LO favorecería la proliferación post-HP. Objetivo: estudiar el efecto de Zi, único inhibidor de 5-LO aprobado para su uso en humanos, en la regeneración hepática post-HP. Métodos y Resultados: ratas Wistar macho adultas fueron sometidas a cirugía simulada (Sham, Sh) o a HP (remoción del 70% del hígado). Animales de ambos grupos recibieron Zi 10 ó 40 mg/kg PC ó su vehículo (V) 2 hs antes de la cirugía y 2 hs antes del sacrificio. Las ratas se sacrificaron 24 hs post-HP (pico de síntesis de ADN). Las dosis de Zi usadas no produjeron toxicidad hepática (actividad sérica de las enzimas ALAT, ASAT, FAL y colinesterasa). El índice de proliferación (inmunohistoquímica de PCNA) mostró una disminución dosis dependiente en los animales HP tratados con Zi (Sh:1,5±0,2*; HPV:26,5±0,5; HPZi10:24,2±0,3*; HPZi40:15,8±0,4*). El análisis de células en G1 mostró una disminución en la entrada al ciclo celular de los hepatocitos en HPZi40 (Sh:1,1±0,1*; HPV:23,0±0,7; HPZi10:21,4±0,3; HPZi40:13,7±0,4*). La medición de los niveles de 5-LO (western blot) mostró una tendencia de cambio no significativa (Sh:121±19; HPV:100±8; HPZi10:146±8; HPZi40:138±20); sin embargo los niveles intrahepáticos de LTB4 disminuyeron de forma dosis dependiente luego del tratamiento con Zi (Sh:4,38±0,17; HPV:3,70±0,10; HPZi10:3,19±0,07*; HPZi40:2,11±0,55* ng/mL). Los niveles proteicos de LTC4 sintetasa no cambiaron entre los grupos HP (Sh:284±37*; HPV:100±11; HPZi10:102±13; HPZi40:107±11) (*p<0,05 vs. HPV). Conclusión: El Zi disminuye la velocidad de regeneración hepática a las 24 hs post-HP probablemente por reducción de los niveles intrahepáticos de LTs; aunque mecanismos adicionales podrían estar involucrados.

300 (303) EFECTO DIFERENCIAL DE UNA LECTINA VEGETAL DE UNIÓN A MANOSA SOBRE LA HEMAGLUTINACIÓN MEDIADA POR EL VIRUS INFLUENZA A

Ana Julia Ticchi[1]; Maríana Regente[1]; Marcela Pinedo[1]; Andrea Lerman[2]; Alejandra Figari[2]; Carlos Cimmino[2]; Osvaldo Uez[2]; Laura De La Canal[1]
Instituto de Investigaciones Biológicas UNMdP-CONICET[1]
Instituto Nacional de Epidemiología "Dr. Juan H. Jara"[2]

El virus influenza A (IAV) ocasiona gran parte de las infecciones respiratorias registradas, y la aparición recurrente de variantes resistentes a los fármacos disponibles refleja la necesidad de nuevos agentes antivirales. La hemaglutinina y la neuraminidasa son las principales glicoproteínas de la superficie viral, cuyas variaciones dan origen a las diferentes cepas de influenza. La especificidad de la unión del virus a las células diana está mediada por la hemaglutinina, que al modificar su sitio de unión al receptor cambia la especificidad de las células huésped de aviares a humanas. Las lectinas pueden mostrar propiedades antimicrobianas y antivirales a través de su interacción con glicoconjugados de la superficie de patógenos. En nuestro laboratorio aislamos una lectina de girasol de unión a manosa (Helja) que mostró capacidad antimicótica frente a levaduras clínicamente relevantes del género *Candida*. El objetivo del presente estudio fue evaluar el potencial de Helja como agente antiviral a través de su capacidad para inhibir la hemaglutinación mediada por el virus influenza. Se determinó entonces el efecto de Helja sobre la hemaglutinación inducida por las variantes virales H1N1 y H3N2. Los resultados obtenidos mostraron que Helja en una dosis de 0,9 µg/ml inhibió la aglutinación de eritrocitos de cobayo mediada por H3N2. Sin embargo, fue incapaz de afectar la hemaglutinación causada por H1N1, incluso en concentraciones hasta 5 veces mayores. Así, Helja exhibe la capacidad de interferir diferencialmente la hemaglutinación dependiendo de la variante de IAV, lo que sugiere una unión selectiva de la lectina a la superficie viral. Por lo tanto, la naturaleza y extensión de la glicosilación de las diferentes cepas parecen ser esenciales en el reconocimiento / unión de Helja a la superficie viral.

GASTROENTEROLOGÍA 1

301 (106) LA TRANSFERENCIA GÉNICA HEPÁTICA DE AQUA- PORINA-1 HUMANA (HAQP1) A RATAS CON COLESTASISINDUCIDA POR ETINILESTRADIOL (EE)

MEJORA LA DISTRIBUCIÓN EN MICRODOMINIOS RAFTS DEL TRANSPOR- TADOR CANALICULAR DE SALES BILIARES (BSEP)

Julieta Marrone; Mauro Danielli; María Cecilia Larocca; Raul Alberto Marinelli
IFISE

La disminución de la excreción biliar (EB) de sales biliares (SB), mediada por la expresión disminuida del transportador canalicular Bsep, contribuye a los mecanismos de colestasis por EE. Previamente demostramos que la expresión canalicular de *h*AQP1, via el adenovector Ad*h*AQP1, atenúa la falla secretoria biliar inducida por EE, en parte, incrementando la EB de SB. Esto se debió a una mayor actividad Bsep sin cambios en su expresión. El objetivo del presente trabajo fue comenzar a dilucidar los mecanismos de activación de Bsep. Debido a que Bsep en membrana canalicular se localiza mayormente, pero no exclusivamente, en microdominios lipídicos ricos en colesterol (*rafts*) y que la actividad Bsep depende en forma directa del contenido de colesterol canalicular, obtuvimos *rafts* y *no-rafts* canaliculares basados en su solubilidad en Tritón X-100 y el enriquecimiento en los marcadores caveolina-1 (*rafts*) o clatrina (*no-rafts*). Ad*h*AQP1 o vector control (VC) fue administrado a ratas EE y no colestásicas. La distribución de Bsep (%) en ratas no colestásicas +VC ó +Ad*h*AQP1 fue: *rafts* 67±4; *no rafts*: 33±4, mientras que en EE fue: *rafts* 32±3; *no rafts*: 68±3. Ad*h*AQP1 restauró la distribución de Bsep cerca de los valores normales (*rafts*: 55±4; *no rafts*: 45±4). La aquaporina endógena AQP8 distribuyó mayoritariamente en *rafts* en todos los grupos (~80%). *h*AQP1 se localizó exclusivamente en *rafts*. El aumento de la proporción de Bsep en *rafts* en ratas EE+Ad*h*AQP1 explicaría, al menos en parte, el aumento de actividad debido al mayor contenido de colesterol y sugeriría una posible interacción molecular entre *h*AQP1 y Bsep que distribuya al transportador de SB preferentemente en *rafts*. En colestasis, la acumulación sistémica y hepática de SB tiene críticos efectos deletéreos sobre la función hepática. Como la transferencia génica de *h*AQP1 claramente mejoró la EB y el nivel sérico de SB, Ad*h*AQP1 podría llegar a ser una efectiva herramienta terapéutica para ciertos desórdenes colestásicos.

302 (120) EL KNOCKDOWN DE LA EXPRESIÓN DE AQUAPORINA-8 MITOCONDRIAL (MTAQP8) DEPRIME LA BIOSÍNTESIS DE COLESTEROL EN CÉLULAS HEPÁTICAS HUMANAS HUH-7

Mauro Danielli; Julieta Marrone; Ariel Daro Quiroga; Raúl Alberto Marinelli
IFISE

Nuestros estudios previos sugieren que la expresión hepática de mtAQP8 es modulada por colesterol vía elementos de respuesta a factores de transcripción SREBP *(sterol regulatory element-binding protein)* presentes en el promotor del gen de AQP8. Considerando que la mtAQP8 hepática facilita la difusión del peróxido de hidrógeno mitocondrial y que el peróxido participa en la regulación de la colesterogénesis hepática, en este trabajo comenzamos a estudiar el papel de mtAQP8 en la biosíntesis del colesterol. Células Huh-7 fueron expuestas a dos siRNA específicos para AQP8 humana (siRNA 1 y 2) diseñados y sintetizados en nuestro laboratorio y a un siRNA control que posee la secuencia nucleotídica del siRNA 1, pero con una disposición al azar (SCR). El *knockdown* de la expresión de mtAQP8 proteína se observó a las 72 h y fue de aproximadamente 50% para ambos siRNA. La colesterogénesis se determinó incubando con [^{14}C]acetato de sodio bajo condiciones basales de cultivo (medio suplementado con 10% suero fetal bovino, SFB) y bajo inducción de la maquinaria de biosíntesis lipídica (6 h de incubación en medio suplementado con 10% suero deficiente en lipoproteínas (SDLP)). Los lípidos recientemente formados fueron separados por cromatografía en capa delgada y posteriormente cuantificados. El grupo inducido, mostró un aumento de la biosíntesis de colesterol de 110% respecto del grupo basal. En ambas condiciones experimentales, los tratamientos con siRNA indujeron una disminución en la biosíntesis del colesterol libre (Basal, siRNA 1: -26,4±2.9%, siRNA 2: -23,5±6.6%. Inducido, siRNA 1: -24,7±2.6%, siRNA 2: -27,1±3.4%; P<0,05 respecto SCR). Resultados similares fueron obtenidos para la biosíntesis de los ésteres de colesterol. La viabilidad celular, determinada por el ensayo de liberación al medio de la enzima LDH, no fue afectada. Los resultados sugieren que la mtAQP8 está involucrada en los mecanismos regulatorios de la síntesis hepática del colesterol.

303 (158) EFECTOS DEL CONSUMO DE TABACO SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE FOSFATASA ALCALINA SALIVAL

Rolando P Juarez; Miguel Acuña; Facundo Ledesma
FAC. DE ODONTOLOGIA UNNE

La medición de fosfatasa alcalina salival (FAs) se utiliza como método auxiliar del diagnóstico convencional de la enfermedad periodontal (EP). El objetivo de este trabajo fue determinar la relación entre el consumo de tabaco sobre la concentración de FAs. Se incluyeron en el estudio 20 sujetos experimentales de sexo masculino, con un rango etario de 20 a 50 años de edad, que fueron divididos de forma aleatoria en dos grupos: Grupo 1 (G1), diez sujetos que afirmaron consumir tabaco y que presentaron un diagnóstico clínico y radiográfico negativo de EP; Grupo 2 (G2), diez sujetos no fumadores con diagnóstico negativo de EP. Se recolectaron muestras de saliva total, que se leyeron en un espectrofotómetro en un rango de absorbancia de 520 nm. Los valores fueron expresados en UI/l. Se obtuvieron los valores promedio y la desviación estándar. Se realizó la prueba de la t para comparar los grupos y se establecieron las correlaciones entre los parámetros bioquímicos y los indicadores del consumo de tabaco mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Las muestras tomadas del G1, dieron una media de 122 DS 18 UI/l, mientras que el G2 mostró una media de 75 DS 6 UI/l, presentando diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de consumidores y no consumidores de tabaco (p=0,0001). La concentración de FAs se encontró estadísticamente correlacionada con el consumo de tabaco (p=0,008). El consumo de tabaco genera una respuesta subclínica en la remodelación ósea, evidenciada en el aumento de marcadores específicos como la FAs. La medición de FAs debe descartarse como método auxiliar del diagnóstico convencional de la EP en pacientes fumadores.

304 (209) PROHIBITINA-1: UN NOVEDOSO LIGANDO DE GALECTINA-1

María Lorena Bacigalupo[1]; Pablo Carabias[1]; Malena Manzi[1]; María Victoria Espelt[1]; María Teresa Elola[1]; Gabriel Adrian Rabinovich[2]; Carlota Wolfenstein-Todel[1]; María Fernanda Troncoso[1]
IQUIFIB (UBA-CONICET), Dpto. Química biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA[1] IBYME (CONICET)[2]

Galectina-1 (Gal1) es una proteína capaz de unir glicanos a través de su dominio de reconocimiento a carbohidratos (CRD). Gal1 se encuentra sobre-expresada en el carcinoma hepatocelular (HCC) y sus niveles de expresión se asocian con una mayor invasión tumoral, metástasis, y menor sobrevida de los pacientes. Nuestro grupo describió que células de HCC humano que sobreexpresan Gal1 promueven el crecimiento tumoral y metástasis en ratones *nude*. Además el incremento de Gal1 en células de HCC induce la transición epitelio-mesénquima, evento clave en la diseminación de las células tumorales. Si bien se han descripto varios ligandos de Gal1 en diversos tejidos, no se ha descripto ninguno en el tejido hepático. El objetivo de este trabajo fue identificar los ligandos de Gal1 a partir de hepatocitos tumorales, utilizando herramientas de proteómica. Primero, expresamos Gal1 recombinante de origen humano (rGal1) en un sistema heterólogo y la purificamos mediante cromatografía de afinidad en una columna de lactosa-agarosa, aprovechando la adsorción de rGal1 a través de su CRD. Luego, obtuvimos lisados de células de HCC humano HepG2 y HuH-7 los cuales se sometieron a una cromatografía de afinidad en una columna de rGal1 acoplada a una matriz Affi-gel 15. Las proteínas adsorbidas se eluyeron con lactosa y se sometieron a SDS-PAGE y digestión proteolítica con tripsina *in gel*. Los péptidos resultantes se analizaron por espectrometría de masa. El estudio de los espectros de fragmentación permitió identificar

a prohibitina-1 (PHB1) como un novedoso ligando de Gal1, con un porcentaje de cobertura del 12%. Confirmamos la expresión de PHB1 en las células de HCC HepG2 y HuH-7 mediante Western blot e inmunofluorescencia. PHB1 es una proteína que modula el crecimiento tumoral, la resistencia a la quimioterapia y la metástasis, a través de diversos mecanismos. Hasta el momento, esta proteína no había sido descripta como ligando de ningún miembro de la familia de las galectinas.

305 (232) DIFERENTES EFECTOS DEL DEOXICOLATO DE SODIO Y DEL ÁCIDO URSODEOXICÓLICO SOBRE LA CAPTACIÓN INTESTINAL DE CALCIO, LA APOPTOSIS Y LA AUTOFAGIA

Valeria A Rodríguez; María A Rivoira; Adriana Pérez; Ana M Marchionatti; Nori G Tolosa De Talamoni
Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, FCM, INICSA-CONICET, UNC

Previamente demostramos que el deoxicolato de sodio (NaDOC) tiene efecto inhibitorio mientras que el ácido ursodeoxicólico (UDCA) es estimulatorio de la absorción intestinal de calcio (Ca^{+2}). El objetivo de este trabajo fue determinar si UDCA tendría capacidad de bloquear la respuesta inhibitoria del NaDOC sobre la captación intestinal de Ca^{+2} y los mecanismos subyacentes tales como la apoptosis y la autofagia. Se utilizaron ratas Wistar machos, controles y tratadas con los ácidos biliares por vía luminal, en forma individual y conjunta, por 30 minutos. La captación de Ca^{+2} se realizó con Cl_2Ca marcado con $^{45}Ca^{+2}$. En mucosa duodenal, se analizó la expresión génica por RT-qPCR y proteica por Western blot de Fas, FasL, pro-caspasa 8, caspasa 8 y LC3 II. La actividad de caspasa 3 se midió por ELISA. La formación de las organelas vesiculares ácidas (OVAs) se evaluó con naranja de acridina. Los datos se analizaron mediante ANOVA a una vía y test de Bonferroni. Los enterocitos maduros de ratas tratadas con NaDOC captaron menos Ca^{+2} que los enterocitos de ratas controles, mientras que los de ratas tratadas con UDCA captaron más que las controles. El tratamiento conjunto bloqueó el efecto inhibitorio de NaDOC. La expresión de Fas y FasL incrementó con NaDOC, mientras que UDCA disminuyó la expresión de estas proteínas. NaDOC produjo disminución de la expresión de pro-caspasa 8, aumento en la expresión de caspasa 8 activa y en la actividad de caspasa 3. La expresión génica de LC3 fue similar en todos los grupos, mientras que la expresión proteica de LC3 II fue mayor con NaDOC en comparación con la de los otros grupos. NaDOC aumentó la formación de OVAs. En conclusión, NaDOC inhibe la captación del catión en enterocitos maduros debido, al menos en parte, por estimulación de la vía extrínseca de la apoptosis y de la autofagia. UDCA bloquea la apoptosis y la autofagia y previene los efectos adversos del NaDOC impidiéndose así la inhibición de la absorción intestinal de Ca^{+2}.

306 (301) PARTICIPACIÓN DE LA VÍA ADENILATO CICLASA-PKA Y SU VINCULACIÓN CON PI3K EN LA ALTERACIÓN DEL TRANSPORTADOR MRP2 INDUCIDA POR TAUROLITOCOLATO

Romina Belén Andermatten; Nadia Ciriaci; Ma. Valeria Razori; Ismael R. Barosso; Enrique J. Sanchez Pozzi
Instituto de Fisiología Experimental CONICET UNR

En condiciones colestásicas, transportadores como Mrp2 abandonan la membrana canalicular sufriendo internalización endocítica. La sal biliar taurolitocolato (TLC) promueve esta desinserción por activación de proteínas de señalización intracelular como PI3K. Últimamente, se ha descrito que adenilato ciclasa (AC) y PKA están implicadas en el modelo de colestasis por estrógenos. Dado que TLC puede aumentar AMPc, planteamos evaluar la participación de la vía AC-PKA en la colestasis inducida por TLC y su relación con la proteína PI3K. METODOLOGÍA: Duplas aisladas de hepatocitos de rata (DAHR) fueron expuestas a TLC (2,5µM) durante 20 min, previa incubación con MDL12330 (MDL, 20µM), KT5720 (KT, 0,25µM) y Wortmanina (WM, 100nM), inhibidores de AC, PKA y PI3K respectivamente. Luego, se expusieron a clorometilfluoresceína diacetato (2,5µM), convertido intracelularmente en glutatión metilfluoresceína (GMF), sustrato de Mrp2. Se analizó por microscopía de fluorescencia la proporción de DAHR capaces de acumular GMF en sus vesículas canaliculares (cVa). Se estudió la interacción entre las vías, evaluando sumación de las acciones protectoras de WM, MDL y KT. RESULTADOS: (% del control±EE;n:2-8) En DAHR tratadas con TLC el porcentaje de GMF acumulado en vesículas canaliculares disminuyó significativamente (57±5a). Al pre-incubar con los inhibidores se revirtió parcialmente la acción de TLC: TLC+WM (77±7a,b), TLC+MDL (80±9a,b) y TLC+KT (74±10a,b). No se observó sumación de efectos de los inhibidores evaluados TLC+KT+WM (79±12a,b) y TLC+MDL+WM (85±4a,b). a diferente de control, b diferente de TLC. P<0.05. CONCLUSIONES: La vía AC-PKA cumple un rol en la disminución de la actividad del transportador Mrp2 inducida por TLC. La falta de sumación de los efectos protectores de WM y los inhibidores MDL y KT sugieren que las proteínas AC y PKA están ubicadas en la misma vía de señalización que PI3K.

307 (302) MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL TRANSPORTADOR MRP2 POR TNF-α: ROL DE LAS PROTEÍNAS PI3K Y ERK1/2

Nadia Ciriaci; Ismael R Barosso; Romina B Andermatten; Paula M Maidágan; M. Laura Ruiz; Enrique J Sánchez Pozzi
INSTITUTO DE FISIOLOGÍA EXPERIMENTAL CONICET UNR

TNF-α junto con IL-1ß e IL-6 media la disminución de la actividad del transportador canalicular Mrp2 producida por lipopolisacárido. Se desconocen las vías de señalización por las que TNF-α altera la función del transportador, pero se sabe que esta citoquina activa PI3K y la MAP quinasa ERK1/2. Objetivo: Evaluar si PI3K y ERK1/2 participan en la alteración del transporte de Mrp2 mediada por TNF-α y si están ubicadas secuencialmente o en vías de señalización distintas. Metodología: Duplas aisladas de hepatocitos de rata (DAHR) se incubaron con TNF-α (6,25pg/ml, 20 min) en presencia del inhibidor de PI3K, Wortmanina (W 100nM); el inhibidor de MEK1/2, PD980589 (PD 5µM, cascada arriba de ERK1/2), y ambos inhibidores en simultáneo. Finalmente, se expusieron a clorometilfluoresceína diacetato (2,5µM) cuyo metabolito, glutatión metilfluoresceína (GMF), es sustrato de Mrp2. Por microscopía de fluorescencia se determinó el porcentaje de DAHR que acumularon GMF en la vesícula canalicular (cVA). En hepatocitos aislados tratados con TNF-α se analizó la activación por fosforilación de las proteínas ERK1/2 y AKT (cascada abajo de PI3K) mediante Western Blot. Resultados: (% del control±EE, n:3-10) TNF-α redujo cVA-GMF (66±3a), mientras que la inhibición de PI3K y MEK1/2 previno la disminución por TNF-α: TNF-α+W (86±4a,b) y TNF-α+PD (84±2a,b). La coinhibición PI3K y MEK1/2 produjo sumación de efectos: TNF-α+W+PD (97±8b,c). El tratamiento con TNF-α provocó un aumento máximo de los niveles fosforilados de AKT (364±64a) y ERK1/2 (223±50a) a los 20min. Estos efectos fueron prevenidos por el agregado de los inhibidores cascada arriba: W (AKT: 112±2b) y PD (ERK1/2 63±32b). a vs control, b vs TNF-α, c vs TNF-α+W o TNF-α+PD, p<0,05. Conclusión: TNF-α produce una disminución de la función de Mrp2 mediada por PI3K y ERK1/2. La sumación del efecto protector de los inhibidores sugiere que PI3K-AKT y MEK-ERK se encuentran en distintas vías de señalización.

308 (356) REGULACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PROTEÍNA ASOCIADA A RESISTENCIA A MULTIDROGAS 2 (MRP2) POR SALES BILIARES EN CÉLULAS INTESTINALES HUMANAS CACO-2

Guillermo Nicolás Tocchetti; Maite Rocío Arana; Agostina Arias; María Laura Ruiz; Juan Pablo Rigalli; Silvina Stella Maris Villanueva; Aldo Domingo Mottino
IFISE

MRP2 es un transportador ATP-dependiente responsable del eflujo intestinal de drogas y contaminantes dietarios, conformando

una barrera contra la absorción intestinal de dichos compuestos. Previamente demostramos que MRP2 es regulable en células Caco-2 en forma aguda por AMPc y por estrógenos colestásicos, resultando en redistribución de su localización en membrana plasmática (MP) vs intracelular (MI). En este trabajo evaluamos si las sales biliares que acceden a la luz intestinal durante la digestión pueden afectar la localización de MRP2. Células Caco-2 se incubaron (30 min) en presencia de bilis humana sintética (BHS), constituida por una mezcla de taurocolato (0,46 mM), glicocolato (0,93 mM), taurodesoxicolato (0,32 mM), glicodesoxicolato (0,64 mM), tauroquenodesoxicolato (0,46 mM) y glicoquenodesoxicolato (0,93 mM). Por centrifugación diferencial se obtuvieron fracciones enriquecidas en MP y MI, evaluándose la expresión de MRP2 por inmunoblot. Villina (MP) y la enzima microsomal UGT (MI) fueron usados como controles de carga. El tratamiento disminuyó la expresión de MRP2 en MP (-54%, $p<0,05$, n=6) y la aumentó en MI (+459%, $p<0,05$, n=6), lo que sugiere internalización del transportador. Al evaluar en forma individual cada una de las sales biliares hallamos que el taurocolato (0,46 mM) y el glicoquenodesoxicolato (0,93 mM) disminuyeron la expresión de MRP2 en MP (-66% y -76%, respectivamente, $p<0,05$, n=4) y la aumentaron en MI (+154% y +103%, respectivamente, $p<0,05$, n=4). Las restantes sales biliares de la BHS no produjeron cambios. No se observaron cambios tras la incubación con dodecil sulfato de sodio 0,01%, descartando que el efecto descripto se deba a una acción inespecífica (detergente) de las sales biliares. Concluimos que taurocolato y glicoquenodesoxicolato son capaces de alterar la normal localización de MRP2, reduciendo su capacidad de barrera química, lo que afectaría la protección contra la absorción de contaminantes dietarios potencialmente tóxicos.

309 (357) EL ÁCIDO LITOCÓLICO PREVIENE EL EFECTO INHIBITORIO DE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE CA+2 DESENCADENADO POR EL DEOXICOLATO DE SODIO MEDIANTE BLOQUEO DE LA APOPTOSIS

Adriana Perez; Ana Marchionatti; María Angelica Rivoira; Valeria A Rodríguez; Nori Tolosa De Talamoni
Bioquímica y Biologia Molecular Fac. de Medicina Univ. Nac. de Cordoba

En un trabajo previo de nuestro laboratorio se demostró que el ácido deoxicólico (DXC), por un mecanismo oxidativo, inhibe la absorción intestinal de Ca^{+2} y afecta la sobrevida celular (Rivoira y col., Comp. Biochem. Physiol., 2012). En base a estos resultados el objetivo del presente trabajo fue determinar si el ácido litocólico (LCA) tendría capacidad de prevenir el efecto inhibitorio del DXC y conocer su efecto individual sobre las vías de absorción intestinal de calcio. Se utilizaron pollos de 4 semanas de edad tratados en el saco intestinal con: 1) solución fisiológica (controles), 2) DXC (10 mmol/L), 3) LCA (200 µmol/L) y 4) tratados con LCA+DXC por 30 minutos. La absorción de calcio, marcado con Ca^{45}, se midió por la técnica del asa intestinal ligada *in situ*. En mucosa duodenal se analizó la expresión génica de Caspasa 3 por PCR en tiempo real y la expresión proteica de Fas y Fas-L por Western blot. También se midieron la actividad de Caspasa 3 por espectrofotometría y en mitocondrias aisladas los cambios en la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial. Los resultados se evaluaron estadísticamente mediante ANOVA a una vía, seguido del test de Bonferroni. Los resultados indican que el tratamiento con LCA no alteró la absorción intestinal de Ca^{2+}, pero LCA+DXC previno el efecto inhibitorio causado por DXC. La administración combinada de LCA+DXC evitó el incremento de la expresión proteica de Fas y Fas-L y de la actividad de Caspasa 3. Además, bloqueó la alteración de la permeabilidad en la membrana interna mitocondrial producida por DXC. En conclusión, LCA previene el efecto inhibitorio ocasionado por DXC sobre la absorción intestinal de Ca^{2+}, al menos en parte, por bloqueo de la vía apoptótica extrínseca.

310 (474) SPARC (PROTEÍNA SECRETADA, ACÍDICA Y RICA EN CISTEÍNAS) Y SU ROL EN EL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO

Agostina Onorato; Catalina Atorrasagasti; Estanislao Peixotto; Guillermo Mazzolini
Universidad Austral Fac. de Cs. Biomédicas

El hígado graso no alcohólico (HGNA) es una entidad con proporciones epidémicas. Consiste en la acumulación de grasa en las células hepáticas y abarca un conjunto de condiciones clínicas que van desde la simple presencia de grasa en el tejido hepático (esteatosis), hasta el desarrollo de daño e inflamación (esteatohepatitis o NASH) y, en algunos casos, fibrosis y cirrosis. Tanto la esteatosis como el NASH se asocian al síndrome metabólico y a la diabetes de tipo 2 (DBT2). SPARC es una glicoproteína de la matriz extracelular asociada a procesos inflamatorios, remodelación tisular, regulación de los depósitos de colágeno fibrilar, entre otras funciones biológicas. El objetivo fue estudiar el rol de SPARC en el desarrollo del HGNA en un modelo murino de dieta rica en grasa. Se administró dieta alta en grasa (HF) o control (LF) a ratones SPARC null ($SPARC^{-/-}$) y SPARC wt ($SPARC^{+/+}$) durante 12 y 20 semanas. La expresión de SPARC fue evaluada por qPCR. Se midió el grado de NASH y fibrosis utilizando el índice de NAS y METAVIR. Se cuantificaron los depósitos de grasa. Se analizaron los niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol y transaminasas en suero. Se realizó el test de sobrecarga a la glucosa para evaluar DBT2. La expresión de SPARC se encuentra incrementada en el hígado de animales alimentados con dieta HF. Las curvas de peso demuestran que los ratones $SPARC^{-/-}$ incrementaron su peso de la misma forma que los $SPARC^{+/+}$HF, mientras que los ratones $SPARC^{-/-}$LF presentan pesos significativamente menores. Luego de 10 semanas, los animales $SPARC^{-/-}$, tanto HF como LF, desarrollan DBT2. Luego de 12 semanas, el grupo $SPARC^{-/-}$HF presenta un índice de esteatosis mayor respecto a los $SPARC^{+/+}$HF (1.7±0.5 vs 0.3±0.1). A semana 20 los animales $SPARC^{-/-}$ HF presentan NASH incipiente (NAS: 5.2±0.4). En este trabajo se presentan evidencias que demuestran un rol de SPARC en el desarrollo de NASH y de DBT2. La ausencia de SPARC se asocia a esteatosis simple e impide la progresión a NASH.

311 (509) AUTOFAGIA MEDIADA POR VMP1 Y SU ROL EN LA MALIGNIDAD DE LAS CÉLULAS TUMORALES PANCREÁTICAS

Felipe Javier Renna; Alejandro Ropolo; Verónica Boggio; Cintia Catrinacio; María Inés Vaccaro
IBIMOL, Subsede Fisiopatología, FFyB-UBA/CONICET

La autofagia es un proceso que degrada componentes citoplasmáticos incluyendo organelas. La transformación tumoral y la quimioterapia activan la expresión de VMP1 que induce autofagia en células tumorales. Nuestra hipótesis propone que la autofagia mediada por VMP1 es parte del mecanismo que conduce a la alta morbilidad y mortalidad en el cáncer de páncreas. El objetivo de este proyecto es evaluar si la autofagia mediada por VMP1 en células tumorales pancreáticas se relaciona con la malignidad y su capacidad de metástasis. Utilizamos células tumorales pancreáticas altamente resistentes al tratamiento (PANC-1 y MIAPaCa-2) que portan la mutación G12D del gen KRAS. Para modular la autofagia mediada por VMP1, las células se trataron con el inhibidor de autofagia 3-metiladenina (3MA) y con el agente quimioterapéutico inductor de VMP1, gemcitabina. Evaluamos migración celular como factor de malignidad mediante ensayos de migración como *Scratch Assay* (capacidad de cerrar una hendidura realizada sobre un cultivo confluente) y *Transwell Assay* (capacidad de migrar de un compartimiento sin suero fetal bovino a uno con presencia del mismo atravesando una membrana de policarbonato). Los resultados mostraron una disminución significativa de la migración medida mediante *Scratch Assay* de un 11% y 16% a las 24 y 48 horas de incubación respectivamente al inhibir la autofagia con 3MA ($p < 0.05$). Por otro lado, la inducción de autofagia con gemcitabina reveló un aumento del 14%, 16% y 17% ($p < 0.001$) de la migración a las 12, 24 y 48 horas de incubación, respectivamente. Mediante la técnica de *Transwell Assay* se logró evidenciar una marcada tendencia de disminución de la migración ante la inhibición de la autofagia y aumento ante su inducción. Estos resultados son de potencial relevancia clínica y proponen a la autofagia como marcador de malignidad tumoral.

312 (546) EFECTO DEL CONSUMO DE FRUCTOSA EN EL AGUA DE BEBIDA SOBRE LAS NEURONAS NADPH+ DEL COLON PROXIMAL DE RATAS

Verónica Labourdette[1]; Facundo Alberto Aburto Santiago[2]; Marta Posadas[1]; María Catalina Olguin[3]; Noriyuki Hisano[2]
Cátedra de Biología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR[1] Càtedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR[2] Càtedra de Química de Alimentos, Facultad de Ciencias Bioquímicas, UNR[3]

El creciente consumo de azúcares en alimentos sólidos y en especial en bebidas analcohólicas ingeridas en reemplazo del agua potable como fuente de hidratación, es motivo de preocupación de las autoridades sanitarias tanto nacionales como internacionales. Publicaciones recientes ubican a nuestro país como líder mundial en el consumo de bebidas gaseosas en las que se emplea como edulcorante el jarabe de maíz de alta fructosa (con más del 55% de fructosa), de gran preponderancia desde los años 80 y sobre el cual se han descripto efectos perjudiciales para la salud. El plexo de Auerbach -cadenas de neuronas ubicadas entre las capas musculares circular y longitudinal del intestino- es el encargado de los movimientos intrínsecos gastrointestinales, controla la actividad motora en toda la longitud del intestino. El objetivo fue evaluar el efecto del consumo de fructosa sobre las neuronas NADPH+ del colon proximal. Para ello a ratas macho púberes de la línea obesa y diabética IIMb/beta, se les suministró por 90 días como agua de bebida una solución acuosa de fructosa al 20% (F,n:7) y al grupo control (C,n:7) agua potable de red. El alimento fue un balanceado comercial para rata/ratón *ad libitum*. Al final se dosó glucemia y los animales fueron eutanasiados. Segmentos del colon proximal se fijaron en paraformaldehido 4% y se procesaron con la técnica histoquímica del NADPH. El material fue fotografiado con cámara digital y se contaron las neuronas con un analizador de imágenes. Resultados (media ± SD): glucemia (mg/dl) F: 224,2 ± 60,6 vs C: 229,6 ± 66,1 ($p>0,05$). Contaje neuronal / mm^2: : C 11.86±2.48 vs F 7.75±1.78, ($p<0,05$). El consumo elevado de fructosa a través del agua de bebida podría afectar la motilidad intestinal ya que el recuento neuronal del plexo de Auerbach a nivel del colon proximal fue significativamente menor en las ratas del grupo F.

313 (565) CAMBIOS ESTRUCTURALES DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO EN UN MODELO DE HIPERAMONEMIA

Juan C Perazzo[1]; Marcotegui A[1]; Tallis S[1]; Skerl J[1]; Caltana L[2];Orbea L[1]; Di Carlo Mb[4]; Romay S[1]; Eizayaga F[1]; Lago Nr[1]; Fisch P[3]; Souto Pa[1]
Fac. de Farmacia y Bioquímica[1] IBCN[2] Albert Ludwigs Universität[3] Htal.d e Clinicas Gral. S. Martin[4]

La hiperamonemia aparece como una grave complicación en los trastornos del metabolismo del amonio y principalmente en la insuficiencia hepática aguda y crónica. En estas circunstancias el tejido renal, el SNC y el músculo esquelético (Me), adquieren un papel preponderante en la regulación de los niveles de amonio en sangre mediante su metabolismo. Esto genera efectos deletéreos en los órganos diana, como el SNC. Objetivos: estudiar si existe alteraciones y/o daño en el Me en un modelo de hipertensión portal prehepática con hiperamonemia moderada (HM). Métodos: ratas macho Wistar se dividieron en dos grupos, HM inducido por estenosis regulada de la vena porta, y Sham (S). Se utilizó inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, microscopía de Alta Resolución y Electrónica de Transmisión para evaluar daño celular. Resultados: Grupo HM presentó hiperamonemia (83,7 ± 1,2 vs. 22,6 ± 2,5 µM/L). La caspasa-3 clivada, el TUNEL y el antígeno antinuclear de células proliferativas (PCNA) fueron significativamente diferentes entre HM vs. S. El grupo HM mostró cambios en el Me, ultraestructurales con necrosis focal y mitocondrias edematizadas con disrupción de la membrana externa, pérdida de crestas y disminución de densidad electrónica matricial. La Tríada mostró dilatación con desprendimiento del sarcolema y con aumento del tráfico de membranas y mitocondrias. Se observó miofibrillinolisis en células tipo I y II del Me, y aumento del número de las células satélite. Los sarcómeros mostraron un área clara con fribrillinolisis, con bandas Z acortadas con aumento de la densidad, lo que indica el daño celular precoz. Además hubo pérdida difusa de bandas sarcoméricas. Conclusión: En este modelo, con niveles moderados de hiperamonemia, el tejido (Me) que realiza el metabolismo secundario de amonio, presenta daño celular irreversible.

METABOLISMO Y NUTRICIÓN 2

314 (21) PROGRAMACIÓN FETAL EN RATAS ALIMENTADAS CON DIETA RICA EN SACAROSA: ¿PUEDE LA SALVIA HISPÁNICA L PREVENIR LA DISLIPEMIA, HIPERTENSIÓN Y ADIPOSIDAD VISCERAL EN LA ADULTEZ?

María A Fortino; Silvia Rodríguez; Adriana Chicco
Univ. Nac. del Litoral Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Diferentes tipos de stress durante la vida intrauterina y postnatales tempranos, incluido mala nutrición, influyen en el desarrollo de enfermedades crónicas del adulto. Dieta rica en sacarosa (DRS) durante la preñez+lactancia (P+L) inducen en la descendencia adulta dislipemia y adiposidad visceral (AV) independientemente del tipo de dieta en la post-lactancia. La incorporación de ácidos grasos polinosaturados n-3 de cadena larga reduce la adipogénesis y la lipogénesis en roedores adultos, pero no es claro el efecto de los mismos en los periodos perinatales. Objetivo: analizar el posible efecto beneficioso de la semilla de chia (rica en alfa-linolénico, 18:3 n-3) en el modelo de dislipidemia y adiposidad inducido precozmente por DRS, cuya fuente grasa es aceite de maíz (rico en 18:2 n-6). Metodología: Durante (P+L) las madres se alimentaron con DRS o con DRS donde la chia fue la fuente grasa (DRSC). Al destete, crías macho de madres DRS continuaron con DRS o con DRSC (DRS-DRS y DRS-DRSC respectivamente) y las crías de madres DRSC continuaron con DRS (DRSC-DRS). Paralelamente se alimentaron madres y sus crías con dieta de referencia (R-R). En madres se evaluó ingesta calórica, ganancia de peso y número de crías. En crías adultas: medidas antropométricas, AV, presión arterial, lípidos y glucosa plasmática. Resultados: 1) la chia administrada durante la preñez previene el efecto deletéreo de la sacarosa respecto al número de crías por camada; 2) En crías adultas la AV no se modificó por la presencia de chia durante la P+L o luego del destete. El peso corporal final, medidas antropométricas e IMC fueron semejantes en todos los grupos. 3) Solo cuando la chia fue administrada luego del destete, aun en presencia de DRS, previno la hipertrigliceridemia e hiperglucemia y atenuó la hipertensión y el contenido de AGNE. Estos resultados enfatizan la idea de una nutrición adecuada durante los primeros estadios de vida para prevenir enfermedades crónicas del adulto.

315 (148) REGULACIÓN DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES POR NRF2 EN CEREBRO DE RATAS CON SOBRECARGA DE COBRE

Nidia Ferrarotti[125]; Rosario Musacco Sebio[13]; Christian Saporito Magri[13]; Juan Manuel Acosta[13]; Mauricio Castro Parodi[14]; Alicia Damiano[14]; Alberto Boveris[15]; Marisa Repetto[135]
Fac. de Farmacia y Bioquímica. UBA[1] Departamento de Bioquímica Clínica, Hospital de Clínicas[2] Cátedra de Química General e Inorgánica[3] Cátedra de Biología Celular y Molecular[4] IBIMOL (UBA-CONICET)[5]

La sobrecarga aguda de cobre (Cu) en cerebro genera estrés y daño oxidativo, con oxidación de glutatión (GSH) y en consecuencia pérdida de la homeostasis redox intracelular en hígado y cerebro. Se observó, en estudio previos, incrementos de la actividad y la expresión de las enzimas antioxidantes Cu,Zn-superóxido dismutasa (SOD1) y catalasa (CAT). El factor de transcripción Nrf2 responde a los cambios de la homeostasis redox intracelular, trasloca al núcleo y activa enzimas antioxidantes como la glutatión transferasa (GT) y la NADPH óxido-reductasa. El objetivo de este

trabajo fue evaluar si los cambios en la actividad y expresión de SOD y CAT están regulados por Nrf2 en la toxicidad aguda del Cu en cerebro. Ratas macho Sprague-Dawley (200 g) recibieron (ip) 5 mg/kg de Cu^{2+} ($CuSO_4$, n=9) y se sacrificaron a diferentes tiempos (0, 6, 16, y 24h). Se determinó el contenido de GSH, el índice GSH/GSSG, la actividad de GT y la expresión por Western blot (WB) de Nrf2 en núcleos de células de cerebro con respecto a ratas control (C, NaCl 0,9% P/V, ip, n=6). Se observó: disminución a las 4 h del 20% la concentración de GSH (2,00±0,05µmol/g) y 89% GSH/GSSG (22±2), un incremento de la actividad de GT del 27% a las 16 h y del 50% a las 24 h (C:2,0±0,2 U/g, p<0,01). Resultados previos mostraron que entre 10 y 12 h de la sobrecarga, la actividad de SOD1 y CAT aumentaron 90% y la expresión 60% respecto a C (SOD1:16KDa, CAT:60 kDa). Los resultados de WB mostraron para Nrf2 dos bandas, una de 66 kDa (proteína sin fosforilar) y otra de 112 kDa, que corresponde a la proteína fosforilada, en núcleos de células de cerebro. Con respecto a C, se observó un aumento significativo (100%) de la banda de 118 kDa, a las 6 h, que indicaría que se expresó en la sobrecarga de Cu posteriormente al consumo de GSH, y previamente a GT, SOD1 y CAT. Conclusión: La protección antioxidante en la toxicidad aguda con Cu por las enzimas antioxidantes SOD y CAT en cerebro estaría regulada por Nrf2.

316 (226) ORIGEN FAMILIAR COMO OTRO FACTOR DE RIESGO DE EXCESO DE HIERRO, EN UN GRUPO DE VARONES DE CABA

Silvana J Fleischman[1]; Marcelo Castro[2]; Jorge A Rey[2]; Alejandra Vellicce[2]; Romina Airaldi[3]; Vanesa Sebastiano[3]; M. Luján Donadío[3]; Marta M Lardo[4]; Ana Lía Felipoff[1]; Silvia H Langini[1]
Cat.Nutrición[1] Ser.Hemoterapia, Htal Clínicas[2] Esc. Nutrición, Fac. Medicina[3] INFIBIOC.FFyB,UBA[4]

La hemocromatosis hereditaria (HH), asociada al gen HFE, se acepta que se originó en el norte de Europa y países que bordean el Mediterráneo. Con el objetivo de estudiar la relación entre ingesta de Hierro (Fe), ascendencia familiar y presencia de mutaciones asociadas al gen HFE, se estudiaron 166 varones donantes de sangre (D), clínicamente sanos, edad (media±DS):36±11años, concurrentes al Serv. Hemoterapia, Htal de Clínicas, UBA, 2012-2014. Los D respondieron un cuestionario de Frecuencia de consumo de Alimentos (QFA), e informaron el origen de sus antecesores. El QFA incluyó entre otros, carnes y derivados, cereales y panificados elaborados con harina enriquecida y consumo de suplementos. Se calculó ingesta de Fe (IFe) por Programa Informático SARA y Tabla de Composición de Alimentos (USDA). En una muestra de sangre entera se identificaron las mutaciones C282Y, H63D y S65C (PCR-RFLP). El 57.4% de D fueron descendientes de europeos (E), 38.3% de latinoamericanos (L), ascendencia mixta (E/L) en 3.1%, otro origen 1.24%. Los E y L no presentaron diferencia significativa en la IFe total (mg/día) (media±DS):22.0± 8.7 vs 22.6± 10.3, pero sí para: IFe hemínico: 1.8±1.1 vs 2.4±1.3, p=0.0012, e IFe no hem de carnes: 4.2±2.7 vs 5.7± 2.8, p=0.0002. La IFe de enriquecimiento de las harinas fue, respectivamente: E vs L: 10.6±6.6 vs 10.8±7.0 (ns). Seis D consumieron suplementos de minerales con Fe (14 o 16.6 mg / comprimido), de los cuales 83% eran E. El porcentaje de D con mutaciones fue: 19.4% en E y 16.1% en L (ns). La prevalencia de H63D fue 83.3% en E y 90% en L; C282Y solo se halló en E (3.2%) y S65C solo en L (1.6%). Dado que el organismo humano no posee mecanismos que le permitan excretar el exceso de hierro, la elevada IFe de la dieta, el eventual consumo de suplementos, y la influencia ancestral europea en Latinoamérica, en particular en Argentina, podrían sumarse al riesgo de padecer HH. Financiado por Universidad de Buenos Aires, UBACyT20720120200004BA

317 (340) EVALUACIÓN DE ENDOTELINA-1 EN HIPOTIROIDISMO SUBCLÍNICO. EFECTO DEL TRATAMIENTO SUSTITUTIVO CON LEVOTIROXINA

Luz Muzzio[1]; Marcos Abalovich[2]; Aizhar Mumbach[2]; Leonardo Cacciagiu[1]; Cristina Calabrese[2]; Graciela Astarita[2]; Betiana Perez[2]; Adriana Vazquez[2]; Mario Frydman[2]; Graciela Alcaraz[2]; Silvia Gutierrez[2]; Laura Schreier[1]
Lab Lípidos y Aterosclerosis. Depto Bioq Clínica. Fac.Farmacia y Bioquímica. INFIBIOC. UBA[1] División Endocrinología Hospital Carlos G Durand. Buenos Aires, Argentina[2]

La endotelina (ET-1) -potente vasoconstrictor y estimulante del crecimiento del músculo liso- promueve la disfunción endotelial junto con otras sustancias proinflamatorias. El hipotiroidismo subclínico (HS) es de considerable prevalencia y se asocia con aumento de riesgo cardiovascular. Los mecanismos que conducen a esta relación son controversiales. La ET-1 podría tener un papel importante favoreciendo el proceso inflamatorio y la disfunción endotelial. Objetivos: Evaluar los niveles de ET-1, perfil lipídico y PCRhs en pacientes con HS en comparación con controles. Determinar los efectos de la terapia con levotiroxina en los parámetros evaluados. Se evaluaron 44 pacientes con HS (T4 normal y TSH>4,2mUI/l) 36,9±9,1 años y 19 pacientes eutiroideos, 30±2,9 años. Se les midió perfil lipidico, ET-1 como marcador de disfunción endotelial (ELISA) y PCRhs como marcador de inflamación crónica (inmunoturbidimétria). Veinticuatro pacientes fueron tratados con levotiroxina y re-evaluados luego de 8.9 ± 3.9 meses de tratamiento. No se observó diferencias en los valores lipídicos entre HS y controles: (mg/dl) triglicéridos 88,8±33,8 vs 77,4±32,1, colesterol 180,7±28,4 vs 172,1±31,5 c-HDL 58,2±17,6 vs 57,7±13,5 y c-LDL 106,9±25,7 vs 99,8±28,3. Los niveles de ET-1 (pg/ml) y PCRhs (mg/l) fueron más altos en HS que en controles: 1.8±0.9 vs 0.8±0.3, p<0.0001 y 1.5 (0.6-3.6) vs 0.5 (0.2-1.1) p<0.008 respectivamente. ET-1 y PCRhs correlacionaron positivamente r= 0,41 p<0,002. Después del tratamiento, ET-1 descendió: 1.8±1,0 vs 1.2±0.5 (pg/ml) p<0,001, aunque persistió significativamente elevada comparada con controles p<0,025) y PCRhs no se modificó. El aumento de ET-1 en pacientes con HS favorecería la disfunción endotelial y constituiría un factor de riesgo aterogénico independiente del perfil lipídico. Este aumento de ET-1 se asoció con el estado inflamatorio crónico. Este cuadro podría mejorar en parte luego del tratamiento con levotiroxina.

318 (392) EL INSUFICIENTE APORTE DE ZINC DURANTE LA PREÑEZ Y LA VIDA POSNATAL TEMPRANA PRODUCE ALTERACIONES EN EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA RENAL DE RATAS DEPENDIENTES DEL SEXO

María N Gobetto[1]; Daniela Cardelli Alcalde[1]; Agustina Castañón[1]; Lorena Juriol[1]; Analía Tomat[1]; Mariela Gironacci[2]; Cristina Arranz[1]
Cátedra de Fisiologia. Fac. de Farmacia y Bioquímica. Univ. de Buenos Aires. IQUIMEFA-CONITET[1] Cátedra de Qca. Biológica. Fac. de Farmacia Y Bioquímica. Univ. de Buenos Aires. IQUIFIB - CONICET[2]

Una deficiencia moderada de zinc durante la preñez y/o el crecimiento provoca hipertensión arterial y disfunción renal en ratas. Nuestro objetivo fue evaluar la participación del Sistema Renina Angiotensina (SRA) renal durante etapas tempranas del desarrollo y en la adultez de ratas macho (m) y hembra (h) sometidas a una deficiencia de zinc. Ratas Wistar fueron expuestas desde la preñez hasta el destete de sus crías a una dieta deficiente en zinc (B) o control (C). Luego del destete, las crías provenientes de las madres B continuaron con dieta B o C (BBm; BBh; BCm y BCh) durante 60 días. Las crías provenientes de madres C continuaron con dieta control (CCm; CCh). A los 6 días de vida se evaluó en riñón de un grupo de ratas (Cm; Ch; Bm y Bh): AT1R y ECA por WB, (AT1R o ECA/β-actina relativo a Cm) y AngII por RIA, (pg/mg de tejido). A los 81 días se evaluó en corteza renal: AT1R por WB e IHQ, expresión de ARNm de ECA por RTqPCR y AngII por RIA. Los valores fueron expresados como x±SEM, n=6/grupo. Estadística: T-test, ANOVA de dos vías y test a posteriori Bonferroni. *p<0,05 vs. Cm; ‡p<0,05 vs. CCm. A los 6 días de vida, Bm presentó mayor expresión de ECA (Bm: 1,4±0,1* vs. Cm: 1,0±0,1) y contenido de AngII (Bm:3035±745* vs. Cm: 823±270). No se observaron cambios en la expresión de AT1R. A los 81 días BBm y BCm tuvieron mayor expresión de AT1R (BBm:2,0±0,2‡, BCm: 2,2±0,4‡ vs. CCm: 1,0±0,1), sólo

BBm presentó aumento de AngII (BBm:3213±888‡ vs. CCm: 886±127). No se observaron cambios en el ARNm de la ECA. Las hembras no presentaron alteraciones. La injuria nutricional producida por un déficit moderado de zinc durante la vida fetal y posnatal temprana activa el SRA renal solamente en las crías macho. Este sistema continúa alterado aun cuando el consumo de zinc durante el crecimiento posdestete es el adecuado. La activación del SRA renal podría contribuir a la hipertensión y a las alteraciones morfológicas y funcionales renales observadas en la vida adulta en este modelo.

319 (424) REGULACIÓN DINÁMICA DE ATP EXTRACELULAR EN ESCHERICHIA COLI

Cora Lilia Alvarez[1]; Natalia Lauri[1]; Gerardo Corradi[1]; Eliana Duarte[1]; Maríana Sacerdoti[1]; Luciano Nievez[1]; Mara Victoria Espelt[1]; Mara Florencia Leal Denis[1]; Vanesa Herlax[2]; Pablo Julio Schwarzbaum[1]
IQUIFIB, Facultad de Farmacia. y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires[1] Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata[2]

E. coli es el principal anaerobio facultativo del sistema digestivo. De acuerdo al contexto fisiológico del huésped, este organismo puede captar ATP exógeno, siendo metabolizado por nucleotidasas en el periplasma, o liberar ATP del periplasma al medio extracelular. *In vitro* la regulación de ATP extracelular (ATPe) de *E. coli* depende del balance entre la liberación de ATP y la hidrólisis de ATPe por nucleotidasas. Se estudió la regulación de ATP extracelular (ATPe) de suspensiones de *E. coli* DH5α ($2x10^9$ cél/ml) a 20 °C. Hidrólisis de ATPe: se evaluó en suspensiones mediante la liberación de [^{32}P]Pi a partir de [γ^{32}P]ATP. En medios con fosfato (M9), a 100-1000 nM ATP, la acumulación de Pi fue lineal en el tiempo y la actividad ATPasica (vi) fue proporcional a la [ATPe]. A 600 nM y 500 µM ATPe vi fue 2,77-19,26 veces superior en un medio sin fosfato (hepes) que en M9. En ambos medios a 600 nM vi fue inhibida 28% por suramina y 71% por el análogo de ATP (AMP-CPP). Liberación de ATP: se evaluó en suspensiones mediante la cuantificación de la [ATPe] por luminiscencia. En ausencia de estimulo, la [ATPe] fue 202 ± nM/10^8 cels. La exposición a 10 µM del péptido mastoparan 7 no afectó la viabilidad, e indujo un aumento de 414 veces en la liberación de ATP, alcanzándose una [ATPe] de 1010 ± nM/10^8 cels (n= 13). La incubación con el péptido melitina produjo liberación de ATP dependiente de la dosis, tanto en ausencia como en presencia de lisis. En conclusión, en suspensiones bacterianas, y en ausencia de lisis, se verificó: - actividad ATPasica en un amplio rango de concentraciones. En medios sin fosfato, vi fue mayor. Esto es compatible con la existencia de dos nucleotidasas, una de las cuales es inhibida por fosfato. - liberación de ATP. Con mastoparan 7 esta liberación es 400 veces superior a la actividad ATPasica. Por lo tanto, la evolución temporal de acumulación de ATPe refleja el perfil cinético de liberación de ATP. Con subsidios UBACYT (20020100100090), CONICET (PIP 639).

320 (439) AUTO ANTICUERPOS CONTRA EL RECEPTOR 2ADRENÉRGICO, INSULINORRESISTENCIA E HIPERINSULI- NEMIA INDUCIDA POR PTOG EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS CRÓNICA

Luz María Rodeles[12]; Miguel Hernán Vicco[12]; Iván Bontempi[1]; Jose Ignacio Valenzuela[2]; Evelyn Cáceres[3]; Maricel Bigliani[3]; Iván Marcipar[1]; Pablo Arias[4]
Laboratorio de Tecnología Inmunológica[1] Área de Clínica Médica, Facultad de Cs. Médicas, Universidad Nacional del Litoral[2] Laboratorio Central, Hospital Iturraspe, Santa Fe.[3] Cátedra de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario[4]

Introducción: La enfermedad de Chagas crónica (ECC) se ha asociado a mayor prevalencia de obesidad y diabetes. Como mecanismo, se ha demostrado aumento de citoquinas pro inflamatorias. Sin embargo, la respuesta inmune a *T.cruzi* además, produce auto anticuerpos dirigidos contra el receptor β2 adrenérgico (anti-2AR) que podrían contribuir al desarrollo de dichas alteraciones. Como objetivo del trabajo, nos propusimos evaluar la relación entre el perfil metabólico y los niveles de anti-β2AR en pacientes con ECC. Métodos: Estudio observacional transversal. Se estudiaron prospectivamente 30 pacientes con ECC y 12 controles pareados por edad, sexo e IMC. Se excluyeron aquellos con diagnóstico previo de diabetes, otras endocrinopatías, IMC >30, tratamiento para Chagas o inmunosupresor. Se realizó tolerancia oral a la glucosa (PTOG) de 75g con muestras a los 0, 30 y 120 min determinándose glucosa e insulina plasmáticas. Los niveles de anti-β2AR en suero fueron medidos por ELISA. Resultados: Los pacientes con ECC presentaron mayores niveles de insulinemia a los 120 min (59.8±39.1 vs 31.2±24.3 mU/l, *p<0.013*) e índice de sensibilidad insulínica ($ISI_{0\text{-}120}$ 13.9±10.6 vs 9.94±4.1, *p=0.041*) en comparación a los controles. Los pacientes positivos para anti-β2AR (n=21) tuvieron mayores niveles de insulina basal, HOMA-IR, índice insulinogénico (IGI) e $ISI_{0\text{-}120}$ (16.8±13.6 vs 9.04±4.83, *p=0.033*; 16.1±12.9 vs 9.31±4.48, *p=0.038* y 74859±67.6 vs 74967±206, *p=0.038*). Los títulos de anti-β2AR presentaron moderada correlación con HOMA-IR (r=0.55; *p=0.007*) e IGI (r=0.34; *p=0.036*). Conclusión: Los pacientes con ECC presentaron mayores niveles de insulina basal e insulinorresistencia durante PTOG. Además, los niveles de anti-2AR se correlacionaron con mayor resistencia insulínica (HOMA-IR) y secreción precoz de dicha hormona. Se continuarán estudios clínicos y experimentales para precisar la relevancia patogénica de anti-2AR en las alteraciones metabólicas detectadas.

321 (522) DETERMINACIÓN DE LA INGESTA DE LECHE MATERNA MEDIANTE LA TÉCNICA DE DILUCIÓN ISOTÓPICA CON DEUTERIO: ESTUDIO DE CASOS

Cristian D Napoli[13]; Silvina Mariela Vidueiros[1]; Cristina Possidoni[2]; Sergio Giordanengo[2]; Inés Fernandez[1]; Anabel Pallaro[1]
Cátedra de Nutrición Facultad de Farmacia y Bioquímica[1] Hospital Sagrado Corazón de Jesús de Basavilbaso, Pcia de Entre Ríos[2] Becario Carrillo-Oñativia, Ministerio de Salud[3]

Introducción: La ingesta de leche materna (ILM) puede estimarse por el método de doble pesada antes y después del amamantamiento, lo cual está sujeto a errores. Es posible conocer con mayor exactitud la ILM utilizando la técnica de dilución isotópica con deuterio de dosis a la madre, el cual es el método de referencia, inocuo y exacto. Objetivo: Determinar la ILM y estimar si los lactantes son alimentados en forma Exclusiva (LME), predominante (LMP) o parcial (LMPA). Sujetos y métodos: Se analizaron cuatro casos correspondientes a 4 pares madre-lactante de la localidad Basavilbaso, provincia de Entre Ríos, a los 4 meses de edad. Las madres recibieron una dosis oral de agua deuterada (30 mL, 99,8%), recolectándose 6 muestras de saliva de la madre y el bebé durante un período de 14 días. El enriquecimiento de deuterio se determinó en un espectrómetro FTIR-Shimadzu-Affinity de la Cátedra de Nutrición, obteniéndose la ILM (ml/día) y la ingesta de otros líquidos (IOL) mediante software específico. Se categorizó la LME, LMP y LMPA según IOL fuera < 22 mL/día, 22–216 mL/día y > 216 mL/día, respectivamente (Haisma 2003). Resultados: La ILM obtenida fue 0, 909, 757 y 539 mientras que la IOL fue 675, 0, 43 y 602 para cada par analizado, respectivamente. De esta manera, el tipo de lactancia correspondiente fue: sin lactancia, exclusiva, predominante y parcial. Conclusiones: La DI permitió determinar la ILM y la IOL provenientes de otras fuentes y en función de este último parámetro estimar el tipo de lactancia que recibe el lactante. Es importante destacar que la aplicación de la metodología podría transferirse como herramienta de evaluación de la alimentación del lactante, siendo de utilidad a futuro para establecer prevalencias de LME. Mejorar la estimación de LME contribuye al conocimiento de la recomendación de OMS y UNICEF de mantener LME hasta el sexto mes de vida. Financiado UBACYT PB04 y OIEA/RLA 6071

322 (523) REMODELADO DE LOS PROTEOGLICANOS DE LA MATRIZ VASCULAR FRENTE A LA INJURIA POR

LIPOPROTEÍNAS RICAS EN TRIGLICÉRIDOS. VLDL DIETA OCCIDENTAL VERSUS DIETA MEDITERRÁNEA

Roxana Elena Oberkersch[1];Aldana Bariandarán[1]; Eugenia Foglino[1]; María Chiara Magnifico[2]; Marzia Arese[2]; Paolo Sarti[2]; Graciela C Calabrese[1]
Facultad de Farmacia y Bioquímica[1] Universidad de Roma "La Sapienza", Italia.[2]

Recientemente hemos reportado que las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) modificarían el patrón de secreción y las características de sulfatación de los principales condroitín/dermatán sulfato proteoglicanos (CS/DS-PGs) de la matriz producida por un endotelio "atero-resistente". El objetivo del presente trabajo fue estudiar el remodelado de los CS/DS PGs frente a la injuria por VLDL obtenidas de voluntarios sanos alimentados con una dieta de tipo occidental y mediterránea. Las lipoproteínas fueron obtenidas a partir de argentinos ($VLDL_{occidental}$) e italianos ($VLDL_{mediterránea}$) y caracterizadas por su perfil bioquímico. Células HUVEC fueron incubadas durante 24h frente a concentraciones crecientes de las lipoproteínas (0, 75, 100 y 140µg/mL). El estudio de los PGs aislados del medio de cultivo fue realizado por Western blot. El porcentaje de triglicéridos, fosfolípidos, colesterol y proteínas de la VLDLoccidental fue de 38,89±12,98; 39,56±12,03; 8,98±2,64 y 12,14±3,26; respectivamente, siendo la relación colesterol/triglicéridos de 0,24±0,05. Las $VLDL_{mediterránea}$ mostraron un aumento en fosfolípidos y un descenso en el porcentaje de triglicéridos (75,72±2,11 y 12,91±2,11; P<0,05; n=3), siendo su relación colesterol/triglicéridos 0,47±0,19. El remodelado de los PGs frente a las $VLDL_{occidental}$ sólo mostró un incremento en versicano y decorina frente a 75µg/mL (P<0,05;n=3). Las $VLDL_{mediterránea}$ produjeron el aumento de versicano y decorina a partir de 75µg/mL (P<0,05;n=3), aumento que se mantuvo frente al incremento de VLDL, principalmente a expensas de decorina. Los resultados obtenidos sugieren: (1) la dieta mediterránea favorece la reducción del core lipídico de las VLDL; (2) esta modificación estructural de la lipoproteína se asocia a un remodelado diferente de los CS/DS PGs de la matriz y (3) El incremento en decorina beneficiaría el ensamblaje de las fibras de colágeno dificultando la migración celular y la activación de la respuesta inflamatoria.

323 (576) EL AUMENTO HIPOTALÁMICO DE POMC EQUILIBRAEL BALANCE ENERGÉTICO EN RATAS HIPOTIROIDEAS

Constanza Matilde Lopez Fontana; Natalia Ortiz; Gisela Pennachio; Sebastián García; Leila Zyla; Flavia Eliana Santiano; Corina Verónica Sasso; Marta Soaje;Rubén Walter Carón
IMBECU

El hipotálamo integra una compleja red de vías neuronales que regulan el balance energético (BE) dependiendo de señales periféricas hormonales, de adiposidad y de saciedad. El hipotiroidismo modifica directa e indirectamente el BE afectando la ingesta y el gasto energético, aunque los mecanismos involucrados no están aclarados. El objetivo fue caracterizar la influencia fisiopatológica del hipotiroidismo sobre la regulación periférica y central del BE en ratas. Se utilizaron ratas hembras Sprague-Dawley de 55 días de edad: eutiroideas (EUT, n=10) e hipotiroideas (HypoT, 0.01% PTU en el agua de beber, n=11). El peso corporal y la ingesta se controlaron semanalmente. El gasto energético (GE) se estimó calculando la tasa metabólica basal (TMB) y mediante la prueba de Open Field. Los animales fueron sacrificados en diestro por decapitación el día 70. El hipotálamo, el tejido adiposo intraabdominal (TAA) y mamario (TAM) se tomaron para el análisis histológico, inmunohistoquímico y qPCR. El análisis estadístico se realizó mediante T Student. Las ratas HypoT presentaron un peso corporal significativamente menor que las EUT (P<0,001) aunque el porcentaje de TAA y TAM fue similar en ambos grupos. La ingesta y la TMB fueron menores en las HypoT (P <0,001), sin observarse diferencias en el actividad locomotora entre ambos grupos. En las ratas HypoT se observó un aumento en la expresión del ARNm de neuropéptido Y probablemente debido a los bajos niveles séricos de leptina, estradiol, tiroxina y hormona de crecimiento determinados por RIA. A su vez, se detectó un aumento del ARNm de proopiomelanocortina en dichos animales mientras que el ARNm de mTOR fue similar en ambos grupos. En conclusión, el hipotiroidismo crónico tiene efectos significativos sobre el peso corporal. Sin embargo, se logra un BE equilibrado mediante un mecanismo compensatorio del sistema de melanocortinas para equilibrar la disminución del GE con una menor ingesta de alimentos.

324 (596) LA OBESIDAD MATERNA CONDICIONA EL METABOLISMO DE LA CRIA FRENTE A LA INGESTA DE UNA DIETA ALTA EN GRASAS

María Victoria Bariani; Ana Paula Domínguez Rubio; Julieta Aisemberg; Ana María Franchi
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos

La prevalencia de la obesidad materna está en aumento y se asocia con resultados perinatales adversos y a un mayor riesgo para la descendencia de contraer enfermedades prematuramente, entre ellas, diabetes y cardiopatías. El sistema endocannabinoide (SEC) está profundamente involucrado en la homeostasis energética, regula la ingesta de alimentos y el almacenamiento de los lípidos. La desregulación del balance energético por los endocannabinoides puede contribuir a la obesidad y a enfermedades asociadas a ésta. Hemos desarrollado un modelo de obesidad materna inducida por la ingesta de una dieta alta en grasas (DAG: alimento estándar +30%grasa) en ratones CD1 silvestres (WT) y deficientes del receptor de cannabinoides tipo1 (KO). Nuestro objetivo fue evaluar el peso y diversos marcadores de obesidad en crías provenientes de madres obesas y controles, frente a la ingesta de la misma DAG o estándar tanto en crías WT y KO. Observamos que el peso al nacer y durante la lactancia fue mayor en crías nacidas de madres obesas (p<0,05), sin importar el genotipo de las mismas. Asimismo, éstas presentaron mayores niveles séricos de colesterol (COL) en el día postnatal 1 (p<0,05), sin mostrar diferencias en los niveles de glucosa ni triglicéridos. Las crías fueron alimentadas hasta los 3 meses de edad con el alimento estándar o con DAG. En el primer caso, estas diferencias dejaron de observarse, sólo las crías KO presentaron mayor peso y mayores niveles de COL en sangre (p<0,05), independientemente de la dieta ingerida por la madre. En cambio, si las crías eran alimentadas con DAG, seguimos observando un mayor peso y mayores niveles de COL en sangre sólo en las crías nacidas de madres obesas (p<0,05). Además, encontramos que el peso del tejido adiposo abdominal también fue significativamente mayor (p<0,05). Estos resultados nos sugieren que el SEC participa en el desarrollo de la obesidad y que la obesidad materna condiciona el metabolismo de las crías a corto y largo plazo.

325 (606) EFFECTO DEL ARSENITO DE SODIO EN EL AGUA DE BEBIDA SOBRE EL PESO Y EL METABOLISMO GLUCÍDICO EN RATAS ADULTAS EXPUESTAS DESDE LA CONCEPCIÓN: DIFERENCIAS SEXUALES.

María Marta Bonaventura[13]; Nadia Bourguignon[1]; Maríanne Bizzozzero[1]; Carlos Libertun[1]; Victoria Lux-Lantos[12] IBYME[1]
Facultad de Medicina UBA[2] Escuela de Ciencia y Técnica - UNSAM[3]

La mayor fuente de exposición humana al arsénico inorgánico (iAs) es el agua potable. Aquí determinamos los efectos de la exposición a arsénico desde la concepción hasta la adultez en el metabolismo glucídico de ratas. Administramos arsenito de sodio en agua de bebida [destilada, 0 (C), 5 (A5) o 50 ppm (A50)] a ratas SD desde el día 1 de preñez hasta el destete de sus crías. Al destete, las crías continuaron con igual tratamiento que sus madres hasta las 8 semanas (sem) de edad, completando un esquema de exposición de 11 sem: vía útero, vía leche materna y luego en el agua de bebida. Se midió el contenido de iAs en hígado (AgDDTC, ISO 2590). Se evaluó el peso corporal (PC) el día de nacimiento y a las 4 y 8 sem de edad. A las 8 sem se evaluaron glucemias e insulinemias basales, Test de tolerancia a la glucosa (TTG, 2 g/kg peso, i.p.), Test de tolerancia a la insulina (TTI, 1 UI/kg peso, i.p.) e índice HOMA-IR. El contenido de iAs

en hígado en C fue menor a 0,5 mg/kg (límite de detección). Si bien en A5 fue detectable, no difirió de C, mientras que en A50 fue significativamente mayor que en C y A5. Ratas A50 de ambos sexos tuvieron menor PC tanto al nacer como a las 4 y 8 sem. El área bajo la curva del TTG (AUC-TTG) fue significativamente mayor en hembras A50 que en C (AUC*10^4: C: 2.15±0.06; A5: 2.26±0.11; A50: 2.46±0.07. ANOVA en dos sentidos: interacción, p<0.04; A50 vs C, p<0.04), sin diferencias en machos. El HOMA-IR también se encontró aumentado en las hembras A50 (C: 1.9±0.1; A5: 2.3±0.3; A50: 2.7±0.2. ANOVA en dos sentidos: interacción, p<0.01; A50 vs C, p<0.03), sin diferencias en machos. El AUC del TTI no mostró diferencias entre grupos, en ningún sexo. El iAs induce una disminución en el PC en ambos sexos. Sin embargo, sus efectos deletéreos sobre el metabolismo glucídico son sexualmente dimórficos, afectando solamente a las hembras. (Con el apoyo de CONICET, UBA, ANPCYT, Fundación René Barón y Johnson & Johnson, Argentina)

326 (614) EFECTO DEL AYUNO SOBRE DIFERENTES PARÁMETROS MITOCONDRIALES EN ANIMALES CONTROLES Y EN UN MODELO DE PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE

Johanna Zuccoli[1]; Silvina Ruspini[1]; Jimena Lavandera[2]; María Del Carmen Martinez[3]; Alcira Batlle[1]; Ana María Buzaleh[13]

CIPYP[1] Cátedra de Bromatología y Nutrición, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL, Santa Fe[2] Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA[3]

La mitocondria juega un rol vital en el metabolismo energético. La biosíntesis del hemo consiste de 8 pasos; 4 ocurren en la mitocondria. Las Porfirias son enfermedades producidas por alteraciones en la vía del hemo. En la Porfiria Aguda Intermitente (PAI) está disminuida la Porfobilinógeno Deaminasa (PBG-D); se caracteriza por ataques agudos con síndrome neuroabdominal, siendo el ayuno uno de los desencadenantes. Previamente observamos que los agentes porfirinogénicos afectan multiples metabolismos en encéfalo. El objetivo fue profundizar el estudio de las alteraciones mitocondriales y en particular de los complejos de la cadena respiratoria en ratones macho *CF1* y en un modelo genético de PAI (T1, PBG-D disminuída) frente al ayuno (24 horas). El efecto se evaluó en mitocondria de encéfalo sobre las enzimas: 5-Aminolevúlico sintetasa (ALA-S), regulatoria del hemo; la hemoproteína Óxido Nítrico Sintasa (mtNOS), y los complejos I-III (NADH-Citocromo C reductasa), II-III (Succinato-citocromo c reductasa), II (succinato deshidrogenasa) y IV (Citocromo C oxidasa) de la cadena respiratoria. La actividad de ALA-S aumentó 13 veces (p<0,01) en los ratones T1 sin variar en los CF1. La expresión de mtNOS se indujo 75% (p<0,05). La actividad de los complejos I-III, II-III y IV varió en ambos grupos. En los CF1, se indujeron las actividades del I-III y del IV (200-233%, p<0,01); la actividad del II-III disminuyó 52% (p<0,01). En los T1, el ayuno causó un efecto similar (aumento 70%, p<0,05) en el complejo I-III, en cambio la respuesta fue opuesta para los complejos II-III y el IV. El complejo II disminuyó 40% (p<0,05) en los T1, sin variar en los CF1. En conclusión, el ayuno afectó en mayor medida las actividades mitocondriales en el modelo de PAI; manifestando una mayor sensibilidad debida a la mutación. Los resultados refuerzan nuestra hipótesis que postula más de una causa para la patofisiología del desencadenamiento del ataque agudo.

METABOLISMO Y NUTRICIÓN 3

327 (25) MECANISMOS INVOLUCRADOS EN EL EFECTO DE LA SEMILLA DE SALVIA HISPÁNICA L. (RICA EN ÁCIDO α-LINOLÉNICO) DIETARIA SOBRE LA LIPOTOXICIDAD Y EL ALTERADO METABOLISMO DE LÍPIDOS EN EL MÚSCULO CARDÍACO DE RATAS DISLIPÉMICAS INSULINO RESISTENTES

Agustina Creus; María R. Ferreira; María E. Oliva; Natalia Alfaro; Yolanda Lombardo

Dpto Cs Biológicas. Lab de Enfermedades Metabólicas relacionadas con la Nutrición. FBCB UNL

Objetivo: Examinar posibles mecanismos involucrados en el alterado metabolismo lipídico presente en el corazón de ratas dislipémicas insulino resistentes (IR) y analizar si la semilla de Salvia *hispánica* L (chia) dietaria puede mejorar/revertir la lipotoxicidad del músculo cardíaco. Metodología: Ratas Wistar recibieron una dieta rica en sacarosa (DRS) durante 3 meses. La mitad de los animales continuaron con DRS hasta los 6 meses y en la otra mitad la semilla de chía reemplazó al aceite de maíz desde los 3 a los 6 meses (DRS+chia). El grupo de referencia consumió una dieta control. En el músculo cardíaco se determinó los niveles de: triglicéridos, acilCoA, y DAG; actividades enzimáticas: M-CPT1 y PDHc y la masa proteica de M-CPT1, FAT/CD36, PPARα y UCP2. Resultados: 1) El corazón del grupo DRS presenta un incremento del contenido lipídico, acompañado de una profunda alteración en la utilización de sustratos energéticos (lípidos-glucosa) 2) La administración de semilla de chia revierte la lipotoxicidad y la disminuida oxidación de la glucosa. Normaliza la incrementada masa proteica del FAT/CD36 a nivel basal y su disminuida translocación a la membrana plasmática frente al estímulo de la insulina. Reduce significativamente (p<0.05) la elevada actividad M-CPT1 sin cambios en su masa proteica. PPAR disminuye levemente sin cambios en la UCP2. Además, Chia normalizó la presión sanguínea. La reversión de la dislipemia y la IR por la semilla de chia dietaria reduce la disponibilidad de ácidos grasos plasmáticos, sugiriendo que un "melieu" diferente al cual está expuesto el músculo cardíaco disminuye la incrementada translocación del FAT/CD36, decreciendo la actividad de M-CPT1 y la acumulación de lípidos mejorando la oxidación de la glucosa. Conclusión: Este trabajo aporta nuevos datos sobre posibles mecanismos involucrados en el efecto beneficioso de la semilla de chia dietaria sobre el metabolismo lipídico y la oxidación de la glucosa en el músculo cardíaco.

328 (77) CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE INTERLEUQUINA 1BETA EN PACIENTES CON DIABETES TIPO 2 DESCOMPENSADA METABÓLICAMENTE Y LUEGO DEL TRATAMIENTO, Y SU ASOCIACIÓN CON SNPS Y CAMBIOS EPIGENÉTICOS

Andrea Elena Iglesias Molli[1]; Alberto Penas Steinhardt[23]; Andrea Milln[1]; Fernanda Bergonzi[1]; Mónica Spalvieri[1]; Mara Amelia Linari[4]; Gloria Edith Cerrone[1]; Gustavo Daniel Frechtel[1]

INIGEM, Laboratorio de Diabetes y Metabolismo, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA-CONICET.[1] IDEHU, División Endocrinología, Hospital de Clínicas "José de San Martín", UBA-CONICET[2] Instituto Universitario en Ciencias de la Salud, Fundación "H.A.Barceló", Secretaría de CyT[3] Sección de Endocrinología y Nutrición, UOM Vicente López[4]

Introducción: La diabetes de tipo 2 (DM2) se caracteriza por presentar un estado de inflamación crónica de bajo grado, que se asoció a una mayor expresión de interleuquina 1 beta (IL-1β). La expresión de esta citoquina se puede ver afectada por SNPs y por la metilación de islas CpG. Objetivos: Estudiar los niveles de expresión génica y proteica de IL-1β en pacientes con DM2 descompensada y luego de la intervención terapéutica; y correlacionarlo con la presencia de SNPs y la metilación de islas CpG en el promotor de dicho gen. Metodología: Se estudiaron 30 pacientes con DM2 descompensados metabólicamente (HbA1c>8%), y luego de 6 y 12 meses de tratamiento (HbA1c<7%). Se realizaron determinaciones bioquímico-clínicas; se determinó la expresión génica y proteica de IL-1β; se genotipificó el SNP -511C/T del gen de IL-1β; y se determinó el porcentaje de metilación en el promotor del gen de IL-1β. Los resultados se analizaron estadísticamente en SPSS 20.0 con un nivel de significación de 0,05. RESULTADOS Luego del tratamiento se evidenció un aumento en la expresión proteica de IL-1β (p=0.0482), sin cambios significativos en la expresión de ARNm. En el promotor del gen de IL-1β se encontraron 3 sitios CpG que disminuyeron

significativamente su porcentaje de metilación luego del tratamiento (p<0.001). El porcentaje de metilación en estos sitios se correlacionó negativamente con el nivel de expresión proteica de IL-1β (p=0.016, r=-0.519; p=0.022, r=-0.498; y p=0.048, r=-0.400 para cada uno). El SNP -511 C/T del gen de IL-1β presentó una frecuencia alélica del 48.33%; y la presencia del alelo polimórfico se asoció a mayores niveles de expresión de ARNm de IL-1β (p=0.006, r=0.515) y a un menor porcentaje de metilación del promotor (p=0.022, r=-0.422). CONCLUSIONES Con la intervención terapéutica en pacientes con DM2 se verificó un aumento en la expresión proteica de IL-1β, que se asoció a un menor porcentaje de metilación del promotor del gen, y a la presencia de polimorfismos.

329 (91) EVALUACIÓN FUNCIONAL DE HDL EN EL SÍNDROME METABÓLICO: DISMINUCIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE HDL

Diego Lucero[1]; Leonardo Cacciagiu[1]; Eduardo Fassio[2]; Alan T Remaley[3]; Laura Schreier[1]
Lab Lípidos y Aterosclerosis. Depto Bioq Clínica. Fac. Farmacia y Bioquímica. INFIBIOC. UBA[1] Servicio de Gastroenterología. Hospital Nacional "Prof. Dr. A. Posadas". Buenos Aires.[2] Lipoprotein Metabolism Section. NHLBI. National Institutes of Health. Bethesda, MD, Estados Unidos.[3]

En un trabajo previo evidenciamos mayor capacidad de eflujo de colesterol por parte de HDL en síndrome metabólico (SMet), asociado a una acumulación de pre-β1-HDL, reflejando una posible demora en la maduración de HDL. Sin embargo, en SMet no está claro si otras funciones de HDL, como la antioxidante, se encuentran afectadas. Objetivo: Estudiar la oxidabilidad de HDL y su capacidad antioxidante *in vitro* en insulino-resistencia (IR). Se estudiaron pacientes con SMet (ATPIII) (n=6) y controles sanos (n=6). En suero (12 h ayuno) determinamos perfil lipídico, glucosa, insulina y HOMA-IR. Además, se determinaron tamaño, nº de partículas y sub-fracciones de HDL por resonancia magnética nuclear (RMN). También, se aisló HDL por ultracentrifugación e *in vitro* se determinó la susceptibilidad de HDL (20 mg prot/dl) a la oxidación provocada con $CuCl_2$ (10 μM) y la capacidad de HDL de inhibir la oxidación de LDL (10 mg prot/dl), midiendo TBARS en cada caso. Resultados: El grupo con SMet mostró las alteraciones características del síndrome, con mayor grado de IR (p=0,03) y mayor cintura (p=0,01), aumento de triglicéridos (p=0,03) y disminución de c-HDL (p=0,05). El análisis de HDL por RMN reveló menor nº de partículas de HDL en SMet (p=0,03), sin diferencias en el perfil de sub-fracciones de HDL. La capacidad de HDL para inhibir la oxidación de LDL se vio disminuida en SMet (17,1±5,5 vs 45,5±26,1%; p=0,04), incluso después de ajustar por c-HDL (F=4,97; p=0,05). La susceptibilidad de HDL a la oxidación *in vitro* no se vio modificada (p=0,64), pero correlacionó positivamente con el tamaño de HDL (r=0,48; p=0,04) y con el nº de partículas de HDL grandes (r=0,68; p=0,02). Conclusiones: En la IR, mas allá de los niveles disminuidos de c-HDL, la capacidad antioxidante de HDL sería menor. Si bien en los casos evaluados la oxidabilidad de HDL no cambió, se infiere que las partículas de HDL grandes serían más fácilmente oxidables, por una mayor disponibilidad de sustrato para oxidación

330 (119) ÁCIDOS GRASOS EN SUERO Y CEREBRO DE RATA: IMPACTO DE DIETAS CON DIFERENTES FUENTES LIPÍDICAS

Paula Daniela Perris; Inés Fernandez; María Del Carmen Sanahuja; María Cecilia Mambrin; Nora Slobodianik; María Susana Feliu
Cátedra Nutrición. FFYB. UBA

Un adecuado perfil de ácidos grasos(AG) en la dieta es importante para el desarrollo del cerebro.El objetivo fue estudiar el efecto de dietas con diferentes fuentes de lípidos en alta concentración sobre el perfil de AG en suero y cerebro de ratas en período de crecimiento activo. Ratas Wistar al destete, fueron alimentadas 10 días con dieta de 40Kcal% de lípidos aportados por: manteca(M); aceite de oliva(O); aceite de girasol alto oleico(AO) y aceite de girasol(G). La dieta control(C)(F%15) contenía aceite de soja. Se determinó el perfil de AG por cromatografía gaseosa. Resultados(% área media±DE): Oleico SUERO M:20,79±4,54*▲O:22.72±4,68*▲ AO:34,35±4.04*▲ G:11.19±1.93 C:10.60±2.01 CEREBRO M:10,84±0,68 O:11,47±1,50 AO:12,04±1,18 G:13,05±0,45 C:11,90±0,61 Linoleico SUERO M:8.91±1.79*▼ O:11.83±2.76*▼ AO:8.92±1.01*▼ G:20.06±0.69 C: 18,66±2,72 CEREBRO M:0,82±0,19*▼ O:1,08±0,20*▼AO:0,75±0,22*▼ G:1,77±0,46 C:1,87±0,55 Linolénico SUERO M:0.41±0.11*▼ O:0.43±0.16 *▼AO:0.26±0.11*▼G:0.30±0.10*▼ C:0,92±0.34 CEREBRO M:0,16±0, 07 O:0,26±0,10 AO:0,22±0,07 G:0,34±0,15*▲ C:0,20±0,08 Eicosapentaenoico SUERO M:0.96±0.42 O:0.67±0.3 AO:0.88±0.19 G:1.26±0.24 C:0.80±0.23 CEREBRO M:0,41±0,13 O:0,50±0,12 AO:0,48±0,16 G:0,83±0,11 C:0,55±0,15 Docosahexaenoico(DHA) SUERO M:1.22±0.30 O:0.74±0.20*▼ AO:0.83±0.18*▼ G:0.50±0.07*▼C:1.33±0.19 CEREBRO M:12,39±0,63 O:12,13±0,61 AO:13,15±1,05*▲ G:10,90±0,76 C:10,71±1,88(*p<0.01 con respecto a C). Los grupos M, O y AO presentan en suero disminución de ácido linoleico y linolénico con aumento de ácido oleico, sugiriendo la exacerbación de la ruta de la familia ω9. En cerebro se observa una disminución de ácido linoleico en los grupos M, O y AO, no evidenciándose las disminuciones de DHA encontradas en suero en O, AO y G. A pesar del corto tiempo de administración de las dietas, el perfil de AG en los grupos estudiados difiere del control como consecuencia del contenido de AG de las diferentes fuentes. (UBACyT20020120200068)

338 (138) ESTRÉS OXIDATIVO Y DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN HÍGADO Y CEREBRO DE RATA POR TOXICIDAD AGUDA DE COBRE

Juan Manuel Acosta[12]; Rosario Musacco Sebio[12]; Christian Saporito Magriñá[12]; Lorelei Cornaló[12]; Mara Victoria Tuttolomondo[13]; Juan Manuel Galdopórpora[13]; Martín Desimone[13]; Alberto Boveris[14]; Marisa Repetto[124]
Univ. de Buenos Aires, Fac. de Farmacia y Bioquímica[1] Cátedra de Química General e Inorgánica[2] Cátedra de Química Analítica Instrumental[3] IBIMOL (UBA-CONICET)[4]

La sobrecarga aguda de cobre (Cu) produce daño oxidativo a fosfolípidos y proteínas de hígado (H) y cerebro (Ce) de rata, mediado por especies reactivas del oxígeno y con incrementos de hasta 18 veces la concentración de Cu en H y 8 veces en Ce respecto del valor basal a las 16 h (H:7,3±0,5 μg/g, Ce:3,6±0,8 μg/g). El objetivo de este trabajo fue evaluar si el daño oxidativo en H y Ce se debe al daño mitocondrial. Se determinó, en mitocondrias de H y Ce de ratas macho Sprague Dawley (200 g), el consumo de O_2 (ΔO_2), la actividad de complejos I y III de la cadena respiratoria y oxidación de fosfolípidos y de proteínas, a distintos tiempos a partir de la sobrecarga de Cu (5 mg/kg, 2 a 24 h). En H, no se observó alteración de la función mitocondrial. En Ce, a las 6 h, el ΔO_2 disminuyó 44% (p<0,01) en estado 3 respecto a C con sustratos del complejo I (C:50±2 nat-gO/min.mg), y 29% (p<0,05) con sustratos del complejo II (C: 35±1 nat-gO/min.mg). A partir de las 10 h ΔO_2 vuelve a los valores basales. Los complejos mitocondriales I-II y II-III disminuyeron su actividad 30% (C:146±4 nmol/min mg proteína) y 25% (C:37±2 nmol/min mg proteína) respectivamente a las 10 h (p<0,01). La oxidación de fosfolípidos en H aumentó significativamente un 100% a partir de las 10 h (C:0,95±0,09 nmol/mg proteína, p<0,05) y en Ce, 30% a las 16 h y 150% a las 24 h (C: 0,85±0,02 nmol/mg proteína, p<0,01). La oxidación de proteínas solamente aumentó en Ce un 60% a las 6 h, y más del 100% a las 16 y 24 h (C:3,10±0,05 nmol/mg proteína, p<0,05). La concentración de Cu en mitocondrias de H alcanzó un máximo de 3 veces C (C:86±14 ng/mg proteína, p<0,01) a las 16 h y en Ce, entre 4 y 8 veces a las 16 y 24 h (C:21±3 ng/mg proteína, p<0,01). Estos resultados indican que el Cu ingresa a mitocondrias de H y Ce, generando daño oxidativo a biomoléculas. La disfunción mitocondrial en cerebro es reversible, indicando que existen mecanismos que las protegen de los efectos tóxicos del metal.

332 (350) PROGRESIÓN DE ESTEATOSIS HEPÁTICA NO ALCOHÓLICA ASOCIADA A INSULINO-RESISTENCIA: FIBROSIS HEPÁTICA Y CARACTERÍSTICAS DE VLDL

Diego Lucero[1]; Gisela Gualano[2]; Graciela I López[1]; Gustavo H López[3]; Valeria Zago[1]; Eduardo Fassio[2]; Laura Schreier
Lab Lípidos y Aterosclerosis. Depto Bioq Clínica. Fac.Farmacia y Bioquímica. INFIBIOC. UBA[1] Servicio de Gastroenterología. Hospital Nacional "Prof. Dr. A. Posadas". Buenos Aires. Argentina[2] Cát de Bioanalítica II. Depto Biología, Bioquímica y Farmacia. Univ Nacional del Sur. B. Blanca[3]

En trabajos previos demostramos que la presencia de esteatosis hepática no alcohólica (EHNA) en la insulino-resistencia (IR) se asocia con producción de VLDL grandes y sobre-enriquecidas en triglicéridos (TG) y de mayor aterogenicidad. Sin embargo, no se conoce que ocurre con VLDL cuando EHNA progresa a estadios mas avanzados como la fibrosis. Objetivo: Evaluar las características de VLDL en distintos estadios de EHNA asociada a IR. Se estudió 36 sujetos con síndrome metabólico (ATPIII) y diagnóstico de EHNA por ultrasonografía/biopsia hepática. Según la histología, los pacientes se dividieron en grupo A: fibrosis severa (F3 y F4, n=9) y grupo B: fibrosis leve/moderada (F0-F2, n=27). En suero (12 h ayuno) se determinó: perfil lipídico, albúmina, hepatograma, glucosa, insulina y HOMA-IR, y se midió colágeno 7S tipo IV, potencial biomarcador de fibrosis. Se aisló VLDL (d<1.006g/L) y se determinó composición química y subfracciones (HPLC exclusión molecular). Además se determinó tiempo de protrombina. Resultados: Grupo A mostró aumento de transaminasas (p<0,01), mayor grado de IR y cintura (p<0,04) y disminución de TG y apoA-I plasmáticos (p<0,04), sin diferencias en albúmina sérica ni en tiempo de protrombina (p=0,54 y p=0,29, respectivamente). El colágeno 7S tipo IV estuvo aumentado en el grupo A (4,7±1,4 *vs* 3,0±1,2ng/ml, p=0,01) y correlacionó positivamente con AST/r=0,60 y ALT/r=0,71 (p=0,01). Llamativamente el grupo A mostró menor masa de VLDL (p=0,01), menor contenido de TG-VLDL (55,7±5,2 *vs* 50,1±5,7%, p=0,014) y menor%VLDL grandes (52,1±13,2 *vs* 32,6±15,6%, p=0,008), esta última se asoció inversamente con colágeno 7S tipo IV (r= -0,57; p<0,01). Conclusiones: El progreso a estadios más avanzados de fibrosis en la EHNA, se asoció con una aparente "normalización" de la VLDL secretada, a pesar del mayor grado de IR, posiblemente como consecuencia temprana del compromiso hepático.

333 (518) NUEVOS AVANCES EN LA PARTICIPACIÓN DE FKBP51 EN EL PROCESO DE LIPÓLISIS

Judith Toneatto; Antonella Lombardi; Graciela Piwien-Pilipuk
IBYME

La obesidad es una pandemia que crece implacablemente año a año. Por lo tanto conocer las moléculas que modulan la adipogénesis y regulan las funciones del adipocito, es relevante para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. La inmunofilina (INM) de alto peso molecular, FKBP51 se halla altamente expresada en adipocitos 3T3-L1 y debido a que se desconoce su función iniciamos su estudio en adipocitos, analizando su posible participación en el control del proceso de lipólisis. En dicho proceso están involucradas numerosas proteínas, tales como la lipasa sensible a hormona (LSH) y la Perilipina, proteína que recubre la superficie de las vesículas lipídicas controlando los procesos de almacenamiento y liberación de triglicéridos. El objetivo de nuestro estudio fue determinar si FKBP51 interactúa con proteínas involucradas en el proceso de lipólisis y dilucidar la importancia funcional de dichas interacciones. Demostramos que cuando la lipólisis es inducida en adipocitos 3T3-L1, FKBP51 colocaliza con LSH fosforilada (P-LSH), es decir su forma activa, observándose un máximo de colocalización a los 5 min de iniciado el estímulo, tiempo necesario para el desplazamiento de LSH a las vesículas lipídicas. Mediante ensayos de inmunoprecipitación encontramos que FKBP51 interactúa tanto con P-LSH como con Perilipina A. Sin embargo la presencia de FK506 (inhibidor de la actividad enzimática peptidil-prolil-isomerasa de la INM) afecta negativamente la interacción de FKBP51 con P-LSH, lo que se acompaña con el aumento de la forma activa de LSH, concomitantemente con el aumento de lipolisis, posiblemente debido en parte a la disrupción de la interacción entre ambas proteinas causada por FK506. Resultados preliminares sugieren que las células HEK 293, capaces de acumular lípidos en su citoplasma, responden de igual manera que los adipocitos 3T3-L1 ante un mismo estímulo lipolítico. Esto permitirá evaluar el efecto de la inhibición y/o sobre-expresión de FKBP51 en el proceso de lipólisis, resultados que serán presentados y discutidos en la presentación del presente trabajo. En síntesis, en los adipocitos 3T3-L1, FKBP51 interactúa con Perilipina A y LSH, interacción que regularía el proceso de lipólisis.

GENÉTICA 2

334 (87) ALGORITMO MOLECULAR DIAGNÓSTICO PARA ESTUDIOS PRENATALES DE DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE/BECKER

Leonela Luce; Irene Szijan; Florencia Giliberto
Cátedra de Genetica y Biología Molecular, FFyB, UBA

Las Distrofias musculares de Duchenne/Becker (DMD/DMB) son enfermedades recesivas ligadas al cromosoma X, originadas por mutaciones en el gen de la Distrofina. DMD es una de las patologías genéticas más frecuentes, afectando a 1 en 3.500 niños. La DMB es menos frecuente, afecta 1 en 18.000. Debido al patrón de herencia, los varones padecen la enfermedad mientras que las mujeres son portadoras asintomáticas. Los casos se clasifican en Familiares (más de 1 afectado, 2/3) o en Esporádicos (sólo 1 afectado, 1/3). Hasta el momento, no existe cura o tratamiento efectivo para detener el desarrollo de estas enfermedades, por ello resulta de suma importancia informar a miembros de familias afectadas respecto del riesgo que poseen de transmitir o padecer la enfermedad. Puesto que no existe una técnica ¨Gold standard¨ para DMD/DMB, se plantea un algoritmo diagnóstico para cada caso particular considerando: caso esporádico o familiar, disponibilidad de muestra del afectado o de un varón sano, alteración molecular identificada o no y tipo de mutación hallada. El objetivo del presente trabajo es ilustrar el algoritmo empleado en estudios prenatales utilizando 5 familias como modelo. Se analizaron 2 casos familiares y 3 casos esporádicos. Para ello, se implementaron técnicas de PCR, MLPA, secuenciación y Segregación de STRs intragénicos. Se estableció que las vellosidades coriónicas no estaban contaminadas con sangre materna y se descartó a todas de padecer la enfermedad. Finalmente, la información que resulta de estos estudios prenatales permite brindar un adecuado asesoramiento genético a las familias afectadas, brindando información necesaria para estudios preimplantatorios y prevenir el nacimiento de nuevos afectados. Además, contribuye en la comprensión de las bases genéticas/moleculares de estas patologías, siendo información imprescindible para los grupos de trabajo dedicados al desarrollo de un tratamiento o cura.

335 (183) EL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCE LA EXPRESIÓN DE ARN NO CODIFICANTE DE ORIGEN TELOMÉRICO

Natalia Maricel Galigniana[1]; Ana María Cabanillas[2]; Graciela Piwien-Pilipuk[1]
IBYME[1] CIBICI[2]

Los telómeros fueron considerados por mucho tiempo como regiones del genoma transcripcionalmente silentes debido a la presencia de múltiples marcadores epigenéticos de heterocromatina. No obstante, en la última década se han identificado ARNs no codificantes transcriptos a partir de los telómeros, conocidos como TERRA (*telomeric repeat-containing RNA*), que se propone controlan la estabilidad estructural de los telómeros y su elongación. Se ha reportado que la inflamación crónica *in vivo* induce disfunción telomérica por sobreproducción de especies reactivas del oxígeno vía COX-2, lo cual es revertido por tratamiento antiinflamatorio ó antioxidante. Consecuentemente, hipotetizamos que los TERRA son modulados por estrés oxidativo. Para abordar el estudio, realizamos curvas de tiempo incubando a las células renales embrionarias humanas HEK-293T en presencia de los agentes oxidantes H_2O_2, arsenito de sodio ó butionina sulfoximina,

y evaluamos la expresión de TERRAs mediante PCR empleando primers específicos y revelando los productos de amplificación en gel de agarosa. Observamos que los TERRA se modulan en forma oscilante dentro de las 2 h de iniciado es estrés oxidativo y que dicho perfil de inducción varía según el agente oxidante utilizado, sin embargo se observó en los tres casos una clara inducción de los niveles de TERRA a las 4 h de tratamiento. El uso del antioxidante N-acetil-L-cisteína previene el aumento de TERRA. También encontramos que la inducción de los TERRA se revierte entre 1-2 h luego de haber cesado el tratamiento con H_2O_2, y al cabo de 24 h ya se encuentran por debajo de los niveles basales. Estos resultados sugieren una expresión dinámica de los TERRA, los que posiblemente ejercerían un rol protector, ya que al desaparecer el agente estresor disminuye rápidamente su expresión.

336 (511) AUTOMATIZACIÓN DEL ANÁLISIS DE DATOS GENÓMICOS EN LA CLÍNICA

Gerónimo Dubra[2]; Sergio I. Nemirovsky[3]; Jonathan J. Zaiat[2]; Marta Cordoba[5]; Martin Vazquez[4]; German F. Burguener[1]; Ezequiel J. Sosa[1]; I Marcelo A. Mart[3]; Marcelo A. Kauffman[5]; Adrian Turjanski[6]

FAC.DE CS.EXACTAS[1] Plataforma de Bioinformática Argentina, Instituto de Cálculo, FCEN, UBA[2] IQUIBICEN/ CONICET[3] INDEAR/CONICET[4] Consultorio y Laboratorio de Neurogenética. IBCN Eduardo de Robertis UBA-CONICET[5] INQUIMAE/CONICET[6]

Las técnicas de secuenciación de alto rendimiento se han convertido en una herramienta ampliamente utilizada en la clínica para el diagnóstico de enfermedades mediante la identificación de variantes genéticas. Sin embargo, el análisis de la información que arrojan es un obstáculo que requiere del manejo de herramientas bioinformáticas complejas. Con el objeto de facilitar el acceso de los profesionales de la salud a los datos genómicos de sus pacientes se desarrolló un "pipeline" automatizado que incorpora las herramientas recomendadas por el Broad Institute (Harvard/MIT) para la obtención de variantes, utiliza SnpEFF/SnpSIFT para anotarlas y las clasifica de acuerdo a su relevancia clínica mediante un "script" generado por nuestro grupo.Con este método se procesaron los datos de secuenciación de diferentes exomas y genomas humanos. En particular se realizó con éxito el análisis de los tres primeros genomas humanos secuenciados en el país, pertenecientes a tres hermanos que presentaban un cuadro clínico correspondiente con un trastorno autista con síntomas de epilepsia y discapacidad intelectual. A partir del análisis de variantes, pudimos identificar una deleción de novo en la línea germinal en el gen SHANK3, de relevancia en el desorden del espectro autista, posteriormente confirmada por el método de Sanger. De esta forma se comprobó la utilidad de implementar un "*pipeline"* para la automatización del análisis genómico para el diagnóstico molecular en la clínica.

337 (516) ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE RHBDD2Y EL EFECTO FENOTÍPICO DE SU SILENCIAMIENTO EN EL CÁNCER DE MAMA

Romina Canzoneri; Ezequiel Lacunza; Martín Carlos Abba

CINIBA Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas Fac de Cs Médicas UNLP

El gen RHBDD2 se encuentra involucrado en la patogenia de neoplasias malignas como el cáncer de mama y de colon. Estudios previos demostraron que su sobreexpresión se asocia a estadíos neoplásicos malignos avanzados y a un mal pronóstico de la enfermedad. El objetivo de este estudio fue el de caracterizar la expresión de las variantes de empalme alternativo de RHBDD2, determinar la localización subcelular de RHBDD2 y analizar el efecto fenotípico de su silenciamiento postranscripcional sobre la proliferación, migración celular y la expresión de moléculas de adhesión a la matriz extracelular. Se diseñaron cebadores para la amplificación de ambas variantes de empalme de ARNm de RHBDD2, flanqueando al exón 2, incluido en la variante 1 pero no en la variante 2. Se estudió su expresión en líneas celulares de cáncer de mama y muestras de tejidos normales y de carcinomas mamarios. Se pudo demostrar que RHBDD2 codifica una proteína transmembrana localizada en el Aparato de Golgi, en las líneas celulares. Por otro lado, se estudió el efecto del silenciamiento de RHBDD2 en la línea MCF7 mediante el ensayo de cierre de la herida, observándose una disminución significativa ($p<0,05$) de la proliferación y la migración celular en correlación con la disminución en los niveles de RHBDD2. Respecto de la expresión de moléculas de adhesión a la matriz extracelular, no se identificaron cambios significativos en función del nivel de expresión de RHBDD2 ($p>0.05$). En cuanto a las variantes de empalme, ambas se expresan en las líneas celulares, los tejidos normales y neoplásicos estudiados. Particularmente, la variante 2 aumenta significativamente tanto su frecuencia como su nivel relativo de expresión ($p<0,05$, en ambos casos) en los carcinomas respecto de los tejidos mamarios normales. Los resultados obtenidos brindan más conocimientos sobre RHBDD2 y abren la puerta a nuevos estudios para determinar la relevancia del mismo en el desarrollo del cáncer de mama.

338 (575) ANÁLISIS DE DESBALANCES GENÓMICOS EN PACIENTES CON CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS CONOTRONCALES

Marisol Delea[1]; Celeste Martinoli[2]; Claudia Picon[3]; María Eugenia Ponce Zalda[4]; Norma Tolaba[5]; Noemí Buzzalino[1]; Liliana Dain[1]

Centro Nacional de Genética Médica – ANLIS, CABA[1] Hospital Sor. María Ludovica provincia de Buenos Aires, La Plata[2] Hospital Pediátrico A. Castelan, Chaco[3] Hospital Castro Rendón, Neuquén, Neuquén[4] Hospital Arturo Oñativia, Salta, Salta[5]

Las cardiopatías congénitas (CC) resultan del desarrollo anómalo del corazón en el período embrio-fetal. Su etiología es heterogénea, pero los factores genéticos serían importantes tanto en casos esporádicos como hereditarios. El objetivo de este trabajo fue analizar afectados con CC conotroncales (CCC) de diferentes centros de referencia de nuestro país para caracterizar las posibles causas genéticas asociadas.Se analizaron 81 pacientes con CCC (60 aisladas y 21 con otra anomalía mayor asociada) de 4 hospitales: Resistencia (Chaco), La Plata (Pcia. de Bs. As.), Neuquén (Capital) y Salta (Capital). Se realizaron estudios de cariotipo por bandeo G, FISH para evaluar la deleción 22q11 y MLPA (SALSA P250-B2 y SALSA P424-B2) a fin de detectar desbalances genómicos. Para 2 de los pacientes se analizaron muestras de los padres.No se observaron anomalías cromosómicas en los casos analizados. La deleción 22q11 se halló en 17 afectados (21%), de los cuales, 9 presentaban sólo la cardiopatía. La misma se asoció significativamente con la interrupción del arco aórtico (5/11; p=0.04) y con la presencia de otra anomalía mayor asociada (8/12; p=0.01). Ninguno de los pacientes con transposición de grandes vasos (n=19) presentó la deleción. Su distribución fue similar en CCC simples o complejas (con otra CC).En 14 pacientes (17%) se observó otra anomalía genómica, entre las cuales los desbalances en 17p fueron los más frecuentes (5/14). Una de las niñas afectadas y su padre presentaron la misma duplicación en 17p. Otra de las pacientes poseía, además de la deleción 22q11, una deleción en la región de TOP3B que también estaba presente en su madre.Nuestros resultados sugieren la necesidad de realizar el análisis de desbalances genómicos en pacientes con CCC ya sean aisladas o asociadas a otra anomalía mayor.

339 (646) ENFOQUE BIOINFORMÁTICO PARA PREDECIR EL POSIBLE EFECTO DELETÉREO DE VARIANTES DE SECUENCIA EN PACIENTES CON DEFICIENCIA EN 21 HIDROXILASA

Carlos David Bruque[12]; Cecilia Soledad Fernández[1]; Marisol Delea[1]; Juan Victoriano Orza[1]; Alejandro Daniel Nadra[3]; Liliana Dain[12]

Centro Nacional de Genética Médica - ANLIS-MALBRAN[1] Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET[2] Departamento de Química Biológica, IQUIBICEN-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Univ[3]

Entre el 90-95% de las Hiperplasias Suprarrenales Congénitas se deben al déficit de la enzima 21-hidroxilasa (21-OH). La 21-OH es un citocromo P450 y posee 2 sustratos: la 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) y la progesterona (P). Recientemente, se reportó el cristal de la 21-OH humana (OID:4Y8W) asociado a P. En trabajos previos de nuestro laboratorio, se realizó el modelado molecular de la 21-OH humana a partir del cristal de la bovina asociado a 17-OHP (OID:3QZ1). El objetivo de este trabajo fue la generación de un modelo predictivo del posible efecto deletéreo de variantes de secuencia en el gen que codifica a la 21-OH a partir del modelo molecular de la 21-OH humana previamente realizado y del cristal de la 21-OH humana. Con el modelo obtenido a partir de la proteína bovina y del cristal de la proteína humana, se generaron 84 mutantes reportadas en la bibliografía para las cuales se conoce su actividad residual (AR) in vitro. Inicialmente se establecieron aquellas variantes deletéreas que se encontraban en sitios de unión al hemo, ligandos o cofactores. Para las mutantes restantes, se determinó la variación de la energía libre asociada a cada variante respecto de la secuencia salvaje mediante el programa Foldx 3.0. Los valores obtenidos se correlacionaron con las AR de los ensayos in vitro mediante una regresión lineal por el método de cuadrados mínimos y se realizó un test de permutaciones para determinar la significancia estadística de la pendiente de ambas rectas. Los resultados obtenidos demostraron un R^2=0.80 y 0.69 para el modelo a partir del OID:3QZ1 y OID:4Y8W, respectivamente, con una significancia estadística de la pendiente para ambas rectas ($p<0.01$). Estos resultados indicarían que la utilización de la estructura molecular de la proteína puede ser una herramienta útil para evaluar los efectos deletéreos de las mutaciones y predecir in silico la actividad enzimática residual.

ONCOLOGÍA 5

340 (19) BACILLUS CALMETTE-GUERIN (BCG) DISMINUYE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR 3 PARA EL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL FIBROBLASTOS (FGFR3) EN CÁNCER DE VEJIGA

Yanina Langle[1]; Denise Belgorosky[1]; Barbara Prack Mc Cormick[1]; Natalia Balarino[1]; Eduardo Sandes[1]; Ana Sahores[2]; Adrian Gongora[2]; Alberto Baldi[2]; Claudia Lanari[2]; Caroline Lamb[2]; Ana María Eijan[1]
Inst. de Oncologia Angel H. Roffo[1] IBYME[2]

Bacilo de Calmette-Guerin (BCG) es el tratamiento estándar para el cáncer de vejiga (CaV) no invasor de alto grado. Demostramos que BCG induce *in vitro* e *in vivo* la muerte de células de CaV murinas MB49, generando una remodelación tisular que involucra al factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF-2). Objetivo: estudiar el efecto que tiene BCG sobre la expresión del FGF-2 y sus receptores (FGFRs) en el CaV. Resultados: *In vitro*, FGF-2 aumenta la proliferación de las MB49, pero no revierte la inhibición del crecimiento inducida por BCG (recuento celular). BCG (2mg/ml) aumenta la expresión de FGF-2 y disminuye la del FGFR3 (western blot) tanto en la línea murina MB49 como en la humana T24. *In vivo*, los tumores MB49 sobre-expresan al FGFR3 respecto al urotelio normal (inmunohistoquímica). El tratamiento con BCG disminuye su expresión correlacionando con la inhibición del crecimiento tumoral en respuesta a la terapia. Diseñamos un ensayo *ex vivo* donde los tumores ortotópicos MB49 se disgregaron y sus células se separaron en dos subcultivos, uno que sirvió de control de expresión del FGFR3 y el otro que se trató con BCG. Observamos una reducción en la expresión del FGFR3 luego del tratamiento con BCG. Utilizando esta misma metodología, realizamos un ensayo piloto utilizando muestras de tumores de vejiga de pacientes (n=11). Determinamos que existe un subgrupo de pacientes (41%) en los cuales el tratamiento *ex vivo* con BCG disminuye el FGFR3 (PCR cuantitativa y western blot). Conclusión: Basados en el modelo de CaV murino podemos sugerir que la down-regulación del FGFR3 es marcador predictivo de respuesta a la terapia con BCG. Esta reducción no sólo ocurre en ratones, sino también en una línea de CaV humana y en un subgrupo de muestras tumorales de pacientes. Mayor número de muestras y el seguimiento de los pacientes serán necesarios para establecer el valor predictivo del FGFR3 como marcador de respuesta al tratamiento con BCG.

341 (248) TRATAMIENTO CON ANTIPROGESTÁGENOS Y DESARROLLO DE METÁSTASIS EN MODELOS PRECLÍNICOS DE CÁNCER DE MAMA CON EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE ISOFORMAS DE RECEPTORES DE PROGESTERONA (RP)

Michelle Marilyn Alvarez[1]; Sebastián Giulianelli[2]; Marina Riggio[1]; Gonzalo Sequeira[1]; María May[1]; Virginia Novaro[1]; Ana Sahores[1]; Caroline Lamb[1]; Claudia Lanari[1]
IByME[1] CENPAT[2]

Hemos demostrado que los antiprogestágenos (AP) sólo inhiben el crecimiento de carcinomas mamarios murinos que muestran mayor expresión de la isoforma A del RP (RPA) que de RPB. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del progestágeno acetato de medroxiprogesterona (MPA) y de dos AP en modelos metastásicos con expresión diferencial de isoformas del RP. Se utilizó la línea celular humana MDA-MB-231 transfectada con RPB, el carcinoma mamario murino C7-2-HI (RPA>RPB), y su variante resistente a AP C7-HI (RPA<RPB). Se inocularon ortotópicamente en ratones NSG ó BALB/c, y al alcanzar los tumores 25 mm2 se implantaron sc pellets controles, de Mifepristona (MFP; 6 mg), Telapristona (TLP; 6 mg) ó MPA (20 mg). Los ratones con tumores MDA-MB-231-RPB mostraron menos focos metastáticos pulmonares que los transfectados con el vector vacío ($p<0,001$). MFP incrementó el número de focos ($p<0,001$) y el MPA los inhibió ($p<0,05$) sólo en los tumores MDA-MB-231-RPB. En concordancia, se observó por inmunohistoquímica una disminución de la expresión del gen supresor de metástasis Nm23-H1 al tratarlos con MFP y un aumento en los tratados con MPA. La expresión del gen prometastásico MMP-2 evaluado por qPCR mostró el patrón inverso. Por otro lado, MFP y TLP inhibieron el crecimiento y metástasis de C7-2-HI (MFP con mayor eficacia que TLP; $p< 0,05$) y MPA no modificó el crecimiento tumoral pero aumentó las metástasis ($p<0,05$). En los C7-HI, MFP aumentó el número de focos metastásicos ($p<0,05$). Demostramos que los AP impiden el desarrollo de metástasis de tumores con mayores niveles de RPA que RPB, mientras que podrían ser promotores de metástasis en tumores con el perfil de expresión inverso, poniendo de manifiesto la importancia de la determinación del patrón de isoformas de RP en tumores de pacientes con cáncer de mama previo al tratamiento con terapias endócrinas anti-RP. MFP tendría mayor efecto terapéutico que TLP en tumores con niveles de RPA mayor que RPB.

6 (258) QUIMIOTERAPIA METRONÓMICA APLICADA A UN ADENOCARCINOMA DE MAMA MURINO (M-406) UTILIZANDO DROGAS EN REPOSICIONAMIENTO

María Virginia Baglioni[14]; María José Rico[124]; Viviana Rosa Rozados[1]; Mauricio Menacho-Márquez[12]; O.Graciela Scharovsky[13]
Instituto de Genética Experimental, Fac. Ciencias Médicas, UNR[1] CONICET[2] CIC-UNR, Rosario[3] Contribuyeron igualmente[4]

El reposicionamiento de drogas en oncología consiste en la utilización de fármacos formulados para otras indicaciones que mostraron potencial antitumoral. Metformina (M) se utiliza para disminuir la glucosa en sangre y Propranolol (P) para enfermedades cardiovasculares. La quimioterapia metronómica (QTM) es un tratamiento crónico con drogas en dosis bajas, a intervalos regulares, sin períodos largos de descanso. Evaluamos el efecto de M y P, individual y combinado, en dosis bajas sobre el crecimiento y desarrollo de metástasis (Mt) del tumor M-406. Se cultivaron células M-406 en condiciones estándares y se determinó su viabilidad (WST-1) en presencia de M (1 a 7,5mM), P (10 a 50µM), o M+P (3,25mM M + 25µM P) y el grado de apoptosis (citometría de flujo con Anexina V e Ioduro de Propidio). La viabilidad disminuyó de modo dosis dependiente (M: $P<0,01$ para 8mM; P: $P<0,01$ en todas las dosis; M+P<0,001) y la apoptosis aumentó (P y M+P,

P<0,05). Se desafiaron ratones hembra adultos CBi, con M-406 s.c.(día 0); al día 3 se distribuyeron en 4 grupos (n=6/grupo) con distintos tratamientos en el agua de bebida: 1) Control, sin tratamiento; 2) M (2 g/l); 3) P (25 mg/l); 4) M+P tratados como 2+3. Los animales se pesaron y los tumores se midieron 2 veces/ semana. El tamaño tumoral disminuyó desde el día 17 en todos los grupos y aumentó el tiempo de duplicación (M: P< 0,01; P: P<0,05; M+P: P< 0,01) y la supervivencia (M+P: P<0,001). Al sacrificio, el n° de Mt pulmonares espontáneas/ratón fue menor en el grupo M+P (P<0,05). Para estudiar las Mt experimentales, los animales se separaron en los 4 grupos mencionados y al día 3 se inyectaron 2x10^5 células, vía i.v. El n° de Mt pulmonares a las 2 semanas fue menor en el grupo M+P (P<0,01). En conclusión, estas drogas en reposicionamiento constituyen una alternativa interesante para el tratamiento del cáncer de mama triple negativo, ya que presentaron efecto antitumoral y antimetastásico, siendo más efectivo el esquema combinado.

343 (403) TERAPIA POR CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO (BNCT) PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES DIFUSOS EN EL PULMÓN EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE METÁSTASIS PULMONARES DE CARCINOMA DE COLON

Verónica Andrea Trivillin[12]; Ayelen Serrano[3]; Lucas L Colombo[245]; Marcela A Garabalino[1]; Emiliano Cc Pozzi[1]; Andrea Monti Hughes[1]; Paula Curotto[1]; Silvia Thorp[1]; Rubén O Farías[1]; Sara J Gonzalez[12]; Silva Bortolussi[6]; Saverio Altieri[6]; María E Itoiz[17]; Romina F Aromando[7]; David W Nigg[8]; Amanda E Schwint[12]

CNEA[1] CONICET[2] UNIV. Favaloro[3] Instituto de Oncología Angel H Roffo[4] Univ. Abierta Interamericana, Argentina[5] Dpto Fisica Nucl. E Teorica e Infn, Italia[6] Fac. Odontologia, Uba[7] IDAHO National Laboratory, USA[8]

BNCT combina la acumulación selectiva de compuestos borados en el tejido tumoral con irradiación con neutrones. Se ha propuesto BNCT para el tratamiento de tumores difusos en pulmón, no resecables. El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia terapéutica de BNCT en un modelo experimental de metástasis pulmonares empleando diferentes parámetros como indicadores de control tumoral, y estudios de sobrevida. Empleando el modelo de metástasis pulmonares de carcinoma de colon en ratas BDIX, se estudió el efecto de BNCT 2 semanas después del tratamiento. Se evaluaron dos niveles de dosis, dosis mínima absorbida en tumor 4 Gy y 8 Gy. Para cada dosis se estudiaron 5 grupos experimentales: T0 (sacrificados pretratamiento), boronofenilalanina-BNCT (BPA-BNCT), BPA + Decahidrodecaborato-BNCT ((BPA + GB-10)-BNCT), Solo Haz y Sham. Se evaluó la respuesta tumoral en términos de 1)% de masa pulmonar / masa corporal (% $mets_{mass}$) 2)% de la superficie de lóbulos pulmonares ocupados por metástasis a nivel macroscópico (% $mets_{macro}$) y 3)% de área ocupada por metástasis en secciones histológicas de pulmón (% $mets_{hist}$). No se observaron cambios clínicos, macroscópicos o histológicos ostensibles en pulmón en ninguno de los grupos. Los parámetros% $mets_{mass}$ y% $mets_{hist}$ exhibieron control tumoral inducido por BNCT estadísticamente significativo (ANOVA) vs Sham (p<0,05) en los dos niveles de dosis. El% $mets_{macro}$ mostró la misma tendencia, pero no alcanzó significación estadística. Los estudios de sobrevida (sacrificio a <70% saturación de oxígeno en sangre) mostraron una duplicación del tiempo de sobrevida sin muertes en el grupo para BNCT (6-7 semanas) vs. Sham (3 semanas). Todos los parámetros y condiciones experimentales del presente trabajo contribuyeron a la evaluación integral del efecto y revelaron consistentemente, con diferente grado de sensibilidad, el control parcial de las metástasis pulmonares por BNCT sin toxicidad pulmonar ostensible.

344 (411) ESTUDIO DEL ROL DE IL-10 E IFN-γ EN UN MODELO MURINO DE INMUNOEDICIÓN TUMORAL

Ángela Paula Oviedo[14]; Antonela Del Giudice[14]; Lucas Pagura[1]; Mauricio Menacho-Márquez[12]; O. Graciela Scharovsky[13]; Viviana R Rozados[1]; María José Rico[12]

Instituto de Genética Experimental, Fac. Ciencias Médicas, UNR[1] CONICET[2] CIC-UNR, Rosario[3] Contribuyeron igualmente[4]

El adenocarcinoma de mama M-406 surgió espontáneamente en la línea de ratones CBi, de la que deriva por selección artificial CBi/L. Cuando CBi/L es desafiada con M-406 s.c. el tumor presenta las tres fases de la inmunoedición tumoral: eliminación (EL), equilibrio (EQ) y escape (ES). Nuestro objetivo fue estudiar: a) los niveles de IL-10 e IFN-γ séricos y en medios condicionados de células mononucleares (MC): basales (BA), en EL, EQ y ES; b) la proliferación de células M-406 en los distintos MC y c) la expresión de receptores de IL-10 (IL-10R) y de IFN-γ (IFN-γR) en células M-406 en EQ y ES. Animales CBi/L se desafiaron con M-406 s.c. y se obtuvieron muestras de sangre y tumor. Las concentraciones en suero, determinadas por ELISA de: [IL-10] en CBi/L (EL) fue mayor que en CBi/L (EQ) (P<0,05) y la de [IFN-γ] en CBi/L (ES) fue mayor que CBi/L (EL, EQ y BA) (P<0,001). En los MC: [IL-10] en CBi/L (ES) fue mayor que CBi/L (EQ) (P<0,05), sin observarse diferencias en la [IFN-γ]; el cociente IFN-γ/IL-10 fue mayor en EQ que en EL (P<0,05). La proliferación de M-406, evaluada con WST-1, se correlacionó negativamente con las distintas [IL-10] de los MC (P<0,01; R=-0,7) y no presentó correlación con [IFN-γ]. Se vio una mayor expresión de IL-10R e IFN-γR, cuantificados por CELISA, en M-406 en ES, comparada con la del tumor en EQ (t de Student, P<0,05). Los resultados obtenidos sugieren que: 1) La [IL-10] sérica aumentada y la de [IFN-γ] disminuida en CBi/L (EL) sugieren su papel anti y pro-tumoral, respectivamente. 2) La correlación negativa observada entre [IL-10] y la proliferación de células de M-406, sugiere que IL-10 estaría involucrada en la inhibición del crecimiento tumoral; 3) El cociente [IFN-γ]/[IL-10] mayor en los MC en EQ comparado con ES sugiere que la prevalencia del perfil Th1 permite mantener el tumor en EQ, 4) Experimentos en curso determinarán el significado biológico del aumento de IL-10R e IFN-γR en el modelo de inmunoedición tumoral.

345 (552) EL BLOQUEO DE LA VÍA HIF-1/AUTOFAGIA AUMENTA LA EFICIENCIA DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON HUMANO: ESTUDIO 2D, 3D E IN VIVO

Matías Exequiel Rodríguez[1]; Cintia Catrinacio[2]; Yanina S. Morán[1]; María I. Colombo[3]; María I. Vaccaro[2]; Viviana A. Rivarola[1]

Univ. Nac. de Río Cuarto[1] Univ. de Buenos Aires[2] Univ. Nac. de Cuyo[3]

El microambiente del tumor posee heterogeneidad de disponibilidad de nutrientes, pH y oxigenación. La hipoxia induce la activación de HIF-1, el cual regula la expresión de genes asociados con la supervivencia celular, incluyendo genes autofágicos. La hipoxia y la autofagia han sido reconocidas como mecanismos de resistencia a tratamientos antitumorales incluyendo la Terapia Fotodinámica (TFD).Objetivo: avaluar el impacto de HIF-1a como modulador de autofágica en cultivos 2D, 3D e *in vivo* de cáncer de colon. Determinar su implicancia en la resistencia a TFD. Resultados: Se demostró que la activación de HIF-1, empleando CoCl2 indujo autofagia a través de un nuevo mecanismo que involucra la regulación transcripcional de VMP1. HIF-1 aumentó el flujo autofágico determinado por un aumento de la relación LC3-II/ LC3-I, disminución de p62, aumento de VMP1 y agregación de GFP-LC3. Además, mediante ensayo de MTT determinamos que la autofagia inducida por HIF-1 promueve resistencia a la TFD. Por otro lado, generamos cultivos tridimensionales que imitan la arquitectura de tumor sólido. Mediante el plásmido reportero 5HRE-EGFP corroboramos la activación de HIF-1. Además generamos líneas estables "K.D" (shHIF1a) y "WT" (Ctrl) y demostramos que los esferoides poseen actividad autofágica dependiente de HIF-1 que confiere resistencia a la TFD. En ambos modelos de estudio, la combinación de TFD con diferentes inhibidores de autofagia aumentó la muerte celular. Utilizando ratones nude se generaron tumores WT, K.D. o WT + cloroquina, luego se trataron con 200 mg/

Kg del ALA-Met y se irradiaron con 60 J/Cm2.Observamos una pobre respuesta de tumores WT y K.D. al tratamiento, sin embargo se observó una disminución en el porcentaje de crecimiento en la combinación de WT+cloroquina+TFD. Conclusión: La activación de autofagia en hipoxia a través de HIF-1/VMP1 confiere resistencia a la TFD. El bloqueo de la autofagia aumenta la eficiencia del tratamiento. Agencia Foncyt - CONICET- SeCyT UNRC

346 (581) 4-METILUMBELIFERONA SENSIBILIZA LÍNEAS CELULARES HUMANAS DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA AL EFECTO DE IMATINIB

Maríangeles Diaz[1]; Daniela Laura Papademetrio[12]; Marilina Mascaró[2]; Matías Pibuel[12]; Elida Alvarez[12]; Silvia Elvira Hajos[12]; Silvina Laura Lompardía[12]
IDEHU-CONICET[1] Cát. de Inmunología, Fac. de Farmacia y Bioquímica, Univ. de Buenos Aires[2]

El ácido hialurónico (AH) activa vías de señalización como PI3K y MAPK de importancia en oncología. La 4-metilumbeliferona (4MU) inhibe su síntesis atenuando así sus señales. Sin embargo, poco se sabe de su implicancia en oncohematología. Previamente reportamos que 4MU inhibe la proliferación de las células humanas de leucemia mieloide crónica K562 y Kv562, mientras que sensibiliza las células Kv562 a la acción de la Vincristina. Dado que la droga de primera línea es Imatinib, el objetivo fue evaluar el efecto de 4MU en combinación con Imatinib sobre diferentes mecanismos biológicos en dichas células. Se utilizó 4MU en dosis de 500 y 100µM e Imatinib en dosis de 0,5 y 0,25µM para K562 y de 2 y 0,5µM para Kv562. La proliferación celular se evaluó mediante incorporación de ^{3}H-T y la senescencia mediante SA-β-gal y SAHF. Los co-tratamientos (Imatinib+4MU) inhibieron la proliferación e incrementaron los niveles de senescencia en ambas células respecto a cada droga por separado ($p<0.01$). Tanto el efecto anti-proliferativo como la inducción de senescencia fueron revertidos por el AH (4MU+Imatinib+HA) ($p<0.01$). La inducción de apoptosis se analizó mediante CF (AnexinaV-PE-7AAD y pico subG1) y microscopía de fluorescencia (DAPI). Ninguna de las combinaciones ensayadas incrementó los niveles de apoptosis respecto a Imatinib ($p>0.05$). Mediante WB se analizó la relación pAkt/Akt y pERK/ERK observándose que en ambas líneas celulares los co-tratamientos (4MU+Imatinib) disminuyeron los niveles de pAkt/Akt de modo similar a cada droga por separado ($p>0.05$). Un efecto similar se observó para pERK/ERK sólo en las células K562 ($p>0.05$). Sin embargo, el agregado de AH a dichos co-tratamientos restituyó los niveles basales de pAkt/Akt en ambas líneas celulares y de pERK/ERK en las células K562. Concluimos que la inhibición de la síntesis de AH mediada por 4MU sensibilizaría a las células K562 y Kv562 a la acción anti-proliferativa de Imatinib induciendo senescencia.

204 (266) PARTICIPACIÓN DE EZH2 EN CÁNCER DE MAMA Y RESISTENCIA A TAMOXIFENO INDUCIDOS POR PROGESTÁGENOS

Mauro Ezequiel Cenciarini; Juan Cruz Gómez Poviña; María Florencia Mercogliano; Noelia Paula Di Giorgio; Roxana Schillaci; Patricia Elizalde; Franco Izzo; Cecilia Jazmín Proietti
IBYME

Los receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (RP) se expresan en ~70% de los cánceres de mama (CM), y los pacientes positivos para el RE son tratados con tamoxifeno (TAM) como terapia endocrina. Sin embargo, más de un tercio de los pacientes no responde a la terapia. Aunque existen evidencias sobre la participación del RP en el desarrollo del CM, los mecanismos moleculares permanecen poco claros. Nuestro laboratorio ha descripto previamente la interacción del RP con la metiltransferasa de histonas EZH2, la cual cataliza la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3) mediando la represión transcripcional del supresor tumoral GATA3. En el presente trabajo estudiamos la participación de EZH2 en los efectos de los progestágenos tanto en la glándula maMaría normal como en CM. Observamos que en ratones BALB/c ovariectomizados, la inoculación de un depósito de progesterona induce el aumento de la expresión de EZH2, H3K27me3 y del marcador de proliferación Ki67, así como la disminución del mRNA de GATA3 en la glándula maMaría normal. Por otro lado, observamos que EZH2 se encuentra sobreexpresada en el modelo de carcinoma mamario murino C4HD inducido por el progestágeno sintético acetato de medroxiprogesterona (MPA), así como en carcinomas ductales mamarios humanos respecto al tejido normal. En la línea celular de CM humano T47D, el silenciamiento de EZH2 previene el aumento de la proliferación celular y la represión transcripcional de GATA3 inducidos por MPA. Por otro lado demostramos que el pretratamiento con MPA induce resistencia a TAM, y que este cambio fue prevenido al silenciar EZH2. A través de un análisis *in silico* observamos que la expresión de EZH2 en pacientes con CM positivos para RP y RE correlaciona con la respuesta a la terapia endocrina. Estos resultados indican que EZH2 es un mediador clave de los efectos del RP en el CM, y que el mismo es un potencial blanco terapéutico para evitar la resistencia al TAM inducida por progestágenos.

TOXICOLOGÍA 2

347 (92) DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y DAÑO OXIDATIVO POR SOBRECARGA DE COBRE EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE HÍGADO DE RATA

Rosario Musacco Sebio[1]; Christian Saporito Magri[1]; Juan Manuel Acosta[1]; Sofa Bajicoff[1]; Paola Paredes Fleitas[1]; Alberto Boveris[2]; Marisa G Repetto[2]
Fac. de Farmacia y Bioquímica[1] Fac. de Farmacia y Bioquímica, IBIMOL (UBA-CONICET)[2]

La enfermedad de Wilson es una patología caracterizada por una alteración en la excreción hepática del cobre (Cu) produciendo un aumento del contenido del metal en el órgano que eventualmente alcanza al resto del organismo. El principal mecanismo propuesto para la toxicidad de la sobrecarga de Cu es la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y el daño oxidativo a biomoléculas que estas especies producen. Una de las principales fuentes de ROS en la célula es la mitocondria, por lo que esta organela tendría un rol importante en la toxicidad del Cu. En este trabajo se estudió el efecto de Cu^{2+} (0-200 µM) en la función mitocondrial (consumo de O_2medido en electrodo tipo Clark) y la peroxidación lipídica (TBARS) en diferentes condiciones y estados metabólicos de mitocondrias aisladas de hígado de rata (machos Sprague Dawley, 200 g). Se observó una disminución en el consumo de O_2 mitocondrial en estado activo (estado 3) respecto al control (C), con sustratos del complejo I (C: 41±8 nat-g O/min.mg) y del complejo II (C: 52±11 nat-g O/min.mg) del 25 y 22% respectivamente con Cu^{2+} 50 µM y del 54 y 75% con Cu^{2+}100 µM, mostrando que la disminución del consumo de O_2 es dependiente de la concentración del metal. El control respiratorio y radio ADP/O se vieron significativamente disminuidos. El aumento del daño oxidativo a fosfolípidos aumentó significativamente (C: 0,09±0,03 nmol/mg, $p<0,05$) con Cu^{2+} 25 µM (250%) hasta un 400% con Cu^{2+} 100 µM.Este aumento se observa cuando las mitocondrias son incubadas con Cu^{2+} en presencia de sustrato (estado 4), no habiendo cambios cuando el Cu^{2+} se encuentra en el mismo medio sin sustrato (0,06±0,02 nmol/mg) por lo que el efecto oxidante del Cu^{2+} sobre los lípidos mitocondriales es dependiente de la producción de H_2O_2.El efecto del Cu^{2+} en la peroxidación lipídica es revertido en un 100% con glutatión (GSH) 4 mM, pero no con GSH 0,5 mM, indicando que la protección antioxidante tiene lugar sólo a altas concentraciones de GSH.

348 (130) MECANISMO DE MUERTE CELULAR IN- DUCIDA POR SOBRECARGA DE COBRE EN HEPATOCITOS PRIMARIOS Y FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS MURINOS

Christian Saporito Magriñá[21]; Christoph Borner[3]; Marisa Repetto[21]

Fac.de Farmacia y Bioquímica, UBA[1] Química General E Inorgánica[2] Albert Ludwigs Universitat (Alemania)[3]

El exceso de cobre (Cu) a nivel sistémico, como se observa en la enfermedad de Wilson, genera daño y muerte celular en distintos órganos, principalmente hígado y cerebro. La interacción entre el Cu libre y el H_2O_2 producido por las células generan una situación de estrés oxidativo que desencadenaría la muerte celular. Objetivos: determinar la producción de especies prooxidantes luego de la sobrecarga de Cu y estudiar si la muerte celular ocurre mediante un mecanismo apoptótico, necrótico o mixto. Resultados: en fibroblastos embrionarios murinos (MEFs), 400 µM de Cu son suficientes para producir una disminución de la viabilidad del 40% en 24 horas mientras que los hepatocitos expuestos a 300 µM de Cu muestran cambios morfológicos y muerte celular apreciable. Esta concentración de Cu genera un aumento de la oxidación de la diclorofluoresceína (DCFH) del 500% a las 8 horas. La oxidación de la DCFH es completamente prevenida en presencia de inhibidores de la síntesis proteica como cicloheximida y actinomicina D. La N-acetilcisteína, no es capaz de prevenir la muerte celular, ni tampoco de disminuir la oxidación de la diclorofluoresceína. La deferoxamina, un quelante de Fe^{3+} fue la única molécula capaz de disminuir la oxidación de la diclorofluoresceína y prevenir parcialmente la muerte celular. La actividad de caspasas no se encontró aumentada ni en hepatocitos, ni en MEFs, como tampoco el clivaje de caspasa 3 por lo cuál la muerte celular no involucra una vía apoptótica. El análisis microscópico de los hepatocitos mostró una morfología típica de hepatocitos necróticos y ausencia de cuerpos apoptóticos. Conclusión: la muerte celular inducida por Cu es un evento puramente necrótico y la generación de especies prooxidantes depende del tipo de célula expuesta al metal. La oxidación de la DCFH mediada por la síntesis de una proteína implica una vía distinta a la interacción entre el H_2O_2 y el Cu libre en la producción de estrés oxidativo al menos en MEFs.

349 (320) EFECTO DE PLOMO SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN A ADIPOCITOS DE FIBROBLASTOS 3T3-L1

Claudia Noemi Martini[2]; Matias Gabrielli[1]; María Magdalena Codesido[2]; Graciela Bonifacino[2];María Del Carmen Vila[1]
IQUIBICEN[1] Dpto Química Biológica, FCEyN, UBA[2]

El plomo (Pb) es un metal pesado y un contaminante ambiental muy difundido, especialmente en zonas industriales, que causa alteraciones bioqímicas y fisiológicas así como alteraciones en el comportamiento, este efecto suele ser mayor en niños. Estudios recientes en niños de la Villa 21-24 y del Barrio Rodrigo Bueno (lindante con un cementerio de automóviles) encontraron valores iguales o mayores a 5µg/dl de plomo en sangre que es el límite de concentración permitido por "Centers for Disease Control and Prevention". En un trabajo reciente, se encontró que la exposición de ratas a Pb causa una disminución de la masa ósea que resulta en una mayor factibilidad de fracturas y que estaría acompañada por una inhibición de la osteogénesis y una estimulación de la adipogénesis a partir de células mesenquimales pluripotenciales. En base a estos antecedentes decidimos evaluar el efecto de una sal de plomo (Pb2+) sobre la proliferación y adipogénesis de fibroblastos 3T3-L1. Estos fibroblastos por agregado de una mezcla que contiene insulina, metilisobutilxantina (MIX) y dexametasona, primero proliferan, proceso que se conoce como expansion clonal mitótica (ECM) y luego se diferencian a adipocitos. Hemos encontrado que la presencia de Pb2+ en concentraciones superiores a 5 µM,es capaz de disminuir la viabilidad e inhibir la proliferación de estas células durante su crecimiento exponencial evaluadas por la técnica de MTT y conteo en cámara de Neubauer. Además, aunque no parece afectar la ECM, el Pb2+ es capaz de inhibir la diferenciación de los fibroblastos 3T3-L1 en concentraciones de 5 µM o mayores y de estimularla en concentraciones inferiores. Nuestros resultados sugieren que Pb2+ altera en función de su concentración dos procesos en los fibroblastos 3T3-L1, su proliferación y su diferenciación a adipocitos.

350 (402) EVALUACIÓN DEL METABOLISMO DEL OXÍ- GENO EN EL SISTEMA CARDIORRESPIRATORIO LUEGO DE LA EXPOSICIÓN AGUDA A NANOPARTICULAS CARGADAS CON NIQUEL

Maríana Garces[2]; Natalia Magnani[2]; Timoteo Marchini[2]; Alejandro Guaglianone[2]; Lourdes Cáceres[2]; Andrea Mebert[3]; Martin Desimone[3]; Luis Diaz[3]; Silvia Alvarez[2]; Pablo Evelson[2]
IBIMOL UBA-CONICET[2] IQUIMEFA UBA-CONICET[3]

La exposición al material particulado (MP) presente en la contaminación ambiental se encuentra asociada a un aumento de la morbilidad y mortalidad a causa de enfermedades cardiopulmonares. Los metales de transición son componentes frecuentes del PM y jugarían un rol central en los mecanismos de daño producidos por la exposición al mismo. Entre ellos, el níquel (Ni) es predominante en el MP derivado de procesos industriales y combustibles fósiles. El objetivo de este trabajo fue analizar el metabolismo oxidativo en el sistema cardiorrespiratorio luego de una exposición aguda a nanoparticulas recubiertas con níquel (Ni-NP). Ratones Swiss fueron instilados por vía intranasal con una suspensión de Ni-NP (1 mg Ni/kg de peso corporal) en una única dosis. El grupo control fue expuesto a nanoparticulas sin níquel. Se tomaron muestras de pulmón, plasma y corazón 1 hora luego del tratamiento. Se evaluó el consumo de O_2 tisular, actividad de NADPH oxidasa (Nox), los niveles de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG), el contenido de TBARS y carbonilos, y la activación de leucocitos polimorfonucleares (PMN) y mononucleares (MN) con las sondas DAF-2 y DCF. En pulmón el grupo tratado con Ni-NP mostró un aumento en el consumo de O_2 tisular (67%; $p<0,001$), un aumento en la actividad de Nox (41%; $p<0,001$), una disminución en la relación GSH/GSSG ($p<0,05$) y un aumento en el contenido de TBARS (35%; $p<0,001$) respecto al grupo control. A nivel sistémico se observó un aumento en TBARS (54%, $p<0,001$) y en la oxidación de DCF en PMN (115%; $p<0,01$) respecto al grupo control. No hubo cambios en la oxidación de DAF-2.En corazón, el consumo de O_2 tisular disminuyó (37%; $p<0,0001$) con NP-Ni y no hubo cambios en TBARS. Los resultados contribuyen a entender los mecanismos fisiopatológicos del sistema cardiorrespiratorio luego de la exposición a metales de transición presentes en el MP, donde el estrés oxidativo y los procesos inflamatorios juegan un rol central.

351 (415) EVALUACIÓN DEL BALANCE REDOX Y DEL DAÑO GENOTÓXICO EN SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL DE RESIDENTES RURALES DEL ALTO VALLE DE RÍO NEGRO

María Martha Quintana[12]; Rovedatti Mara Gabriela[3]; Berta Vera[12]; Gladis Magnarelli[12]
LIBIQUIMA, Facultad de Ingenieria, Univ. Nac.del Comahue[1] . Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, U[2] Dpto Biodiversidad y Biologia Exp, Fac. Cs Exactas, UBA[3]

Los organofosforados (OF) plaguicidas utilizados en el Alto Valle de Río Negro, son agentes cuya neurotoxicidad se basa en la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa. Dado que los OF producen estrés oxidativo en diversos sistemas experimentales, el objetivo de este trabajo fue identificar si la exposición ambiental a OF produce alteraciones en el balance redox y en el nivel de daño genotóxico en el compartimiento fetal.Se llevó a cabo un estudio de corte transversal con población residente en zonas rurales de uso intensivo de OF en período de pulverización (PoP), en período de receso (PoR) y con un grupo control no expuesto de zona urbana (PoC). Se utilizaron criterios de inclusión/exclusión y se obtuvo el consentimiento informado. En sangre de cordón umbilical se analizaron los biomarcadores de referencia, actividad de colinesterasa plasmática y eritrocitaria y la actividad de enzimas de la defensa antioxidante, catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) en hemolisados de eritrocitos (ER). Adicionalmente se determinó, resistencia globular (RG) y el daño genotóxico por ensayo cometa. Si bien no se afectaron las colinesterasas ni CAT en PoP, la actividad de SOD fue significativamente menor ($P<0,05$) en PoP

(n=22) que en PoR (n=22). También la RG disminuyó en los ER de PoP (n=15) vs PoR (n=22) (p<0,05).Se halló aumento significativo del daño genotóxico en PoP (n=14) vs población control (PoC) (n=15) (p<0,05). La disminución en la defensa antioxidante (SOD) de los ER se asociaría a la disminución de la RG, una medida de la integridad de membrana. Aunque se requiere ampliar el muestreo, la residencia rural sería un factor de riesgo para el daño genotóxico en leucocitos. Las alteraciones observadas sugieren que la homeostasis redox se encuentra alterada en PoP, lo que podría tener consecuencias en la salud a corto y/o largo plazo.Agradecimientos: Méd. M. Curioni., S. Santa Cruz., C. Muntaner Subsidios: UNCo.

352 (555) HERBICIDAS A BASE DE GLIFOSATO CON DIFERENTES ADYUVANTES SON MÁS POTENTES INHIBIDORES DE LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN A ADIPOCITOS DE FIBROBLASTOS 3T3-L1 QUE GLIFOSATO PURO

Claudia Noemi Martini[2]; Matias Gabrielli[1]; María Magdalena Codesido[2];María Del Carmen Vila[1]
IQUIBICEN[1] Departamento Química Biológica, FCEyN,UBA[2]

Los herbicidas a base de glifosato se utilizan intensamente en todo el mundo para controlar el crecimiento de malezas en las áreas plantadas con cultivos resistentes a este herbicida. Por lo tanto, es importante investigar el posible efecto tóxico de estas preparaciones comerciales que contienen no sólo glifosato sino también distintos adyuvantes, algunos de ellos polietoxilados. Previamente, hemos informado que una preparación comercial de glifosato inhibe la proliferación y diferenciación a adipocitos de los fibroblastos 3T3-L1. En la presente investigación, evaluamos el efecto de diferentes herbicidas a base de glifosato y comparamos sus efectos con el glifosato puro. Encontramos que las tres formulaciones ensayadas fueron más potentes que el glifosato puro para inhibir la proliferación y diferenciación de estas células. Es decir que los adyuvantes presentes en las preparaciones comerciales contribuyen al efecto tóxico. Mediante un análisis de MALDI encontramos que los espectros de dos de ellas, son consistentes con la presencia de adyuvantes polietoxilados, no siendo así en la tercera preparación, a pesar de tener un capacidad inhibitoria similar. Por otro lado, observamos que la extensión del tiempo de ensayo de 24 a 72 hs permitió disminuir la concentración necesaria para inhibir la proliferación. Esto sugiere que concentraciones aún más bajas podrían ser efectivas a tiempos más largos de exposición, lo cual puede tener lugar en las zonas de aplicación de estos herbicidas comerciales. Nuestros resultados contribuyen a dilucidar los efectos citotóxicos de los hebicidas a base de glifosato y a mostrar la importancia de evaluar el efecto de las preparaciones comerciales más que del glifosato puro.

353 (570) EL ARSÉNICO COMO DISRUPTOR ENDOCRINO: EFECTOS XENOESTROGÉNICOS SOBRE LA ADENOHIPÓFISIS Y EL ÚTERO DE LA RATA

Sonia Ronchetti; Jimena Cabilla; Yanina Benzo; Gisela Novack; Beatriz H. Duvilanski
INBIOMED

El arsénico es un metaloide ampliamente distribuido en el ambiente con potentes efectos tóxicos. La contaminación provocada por arsénico inorgánico (iAs) es uno de los mayores problemas sanitarios a nivel mundial. El estrógeno (E2) cumple un papel clave en la proliferación celular de tejidos hormonadependientes. Se ha demostrado en la línea tumoral de mama MCF-7 que el iAs interactúa con el receptor de estrógenos alfa (REα) y reproduce las acciones del E2 induciendo la proliferación celular. Sin embargo, hasta el momento los efectos simil-E2 del iAs no han sido estudiadas in vivo. Objetivo: investigar el papel del iAs como agente xenoestrogénico en la adenohipófisis y en el útero. Métodos y resultados: ratas adultas ovariectomizadas (OVX) se expusieron o no (control) al iAs 0.1 ppm en el agua de bebida durante 30 días. Otro grupo se implantó s.c. con cápsulas de 500 µg de E2 (control positivo). Se monitoreó la citología vaginal y el consumo de agua. Se realizaron estudios histológicos y de expresión proteica. La exposición al iAs aumentó la frecuencia de aparición de exudado vaginal compatible con proestros y estros a diferencia del grupo control en diestro permanente. En la adenohipófisis, estimuló la proliferación celular de los lactotropos, la secreción de prolactina y la expresión del REα y de su variante truncada. En el útero, el iAs causó modificaciones citoestructurales características de un efecto estrogénico (aumento del área glandular y de la altura del epitelio). El iAs incrementó la expresión del REα en las células epiteliales y en el estroma. Conclusión: El iAs, a una dosis baja, reproduce las acciones del E2 estimulando la proliferación celular en la adenohipófisis y el útero. Estos resultados indican que el metaloide, actuando como un xenoestrógeno, puede promover el desarrollo de patologías preneoplásicas o neoplásicas en tejidos hormona-dependientes.

REPRODUCCIÓN 4

354 (37) LA VÍA DE PI3K/AKT SE ENCUENTRA ALTERADA EN EL ENDOMETRIO DE PACIENTES CON ENDOMETRIOSIS Y PRESENTA DIFERENCIAS SEGÚN EL GRADO DE SEVERIDAD

Daniela Madanes[1]; Carla Noemí Olivares[1]; Juan Ignacio Bastón[1]; Mariela Andrea Bilotas[1]; José Javier Singla[2]; Gabriela Fabiana Meresman[1]; Rosa Inés Barañao[1]; Analía Gabirela Ricci[1]
IBYME[1] Hospital de Clínicas "José de San Martín"[2]

Introducción: Se sabe que el NF-κB es un factor nuclear cuya activación da lugar a procesos antiapoptóticos, proliferativos e inflamatorios. Diversos genes que se encuentran desregulados en la endometriosis (EDT), son blanco de NF-□B y se ha demostrado que está constitutivamente activado en lesiones endometriósicas. Por otra parte, la vía de PI3K/Akt regula la activación de este factor en diferentes modelos, y recientemente demostraron que Akt esta sobreactivado en células endometriales de pacientes con EDT. OBJETIVOS: Evaluar la expresión proteica de PI3K, p-Akt, Akt y PTEN en lesiones endometriósicas y en endometrio eutópico de pacientes con EDT y de mujeres controles. Comparar los niveles de expresión de estas proteínas en diferentes grados de severidad de EDT (estadíos I-II vs. III-IV). Metodología: Se seleccionaron mujeres en edad reproductiva que se sometieron a laparoscopías diagnósticas, utilizando biopsias de lesiones endometriósicas y de endometrio eutópico de pacientes con y sin EDT. Los niveles proteicos fueron cuantificados por Western Blot. RESULTADOS: Observamos una mayor expresión de los niveles de PI3K y p-Akt (p<0.01/p<0.001 vs. Control) y una menor expresión de PTEN (p<0.01/p<0.05 vs. Control) en tejido endometriósico y endometrio eutópico de pacientes con EDT. Por otra parte, observamos una menor expresión de PTEN en lesiones de pacientes con EDT estadío I-II, así como mayores niveles de p-Akt (p<0.01/p<0.05 vs. III-IV). Conclusiones: Demostramos por primera vez la expresión alterada de la vía PI3K/Akt en biopsias de pacientes con EDT. Además es el primer antecedente que demuestra una menor expresión de PTEN en EDT mínima a moderada. Considerando que la sobreexpresión de PI3K ha sido relacionada con diferentes tipos de cáncer, y que la inactivación de PTEN es un evento temprano en carcinomas ováricos relacionados con EDT, este trabajo sugiere nuevos marcadores posibles y/ó blancos terapéuticos acordes al grado de severidad de la enfermedad.

355 (89) EVALUACIÓN REPRODUCTIVA EN RATONES HEMBRAS ALIMENTADAS CON DOSIS VARIABLES DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3

Santiago Bianconi[1]; María Del Rosario Solis[2]; María Emilia Santillan[2]; Valeria Paola Carlini[1]; Graciela Stutz[2]
INICSA[1] Cátedra de Fisiología Humana, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba[2]

La composición lipídica de los tejidos reproductivos guarda relación con el consumo dietario. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) omega 3 (n-3) participan en la función reproductiva

modificando la estructura y fluidez de las membranas y la síntesis de prostaglandinas, entre otros mecanismos probados. Cuatro grupos de ratones hembras *Albino swiss* -durante gestación y lactancia- y luego sus crías -desde destete hasta adultez- fueron alimentados con: D (deficiente en n-3; dieta purificada; 7% aceite de girasol; PUFAs: 3,48%; n-3: 0%; n-6/n-3: 0), A (adecuada en n-3; dieta purificada; 7% aceite de soja; PUFAs: 3,85%; n-3: 0,57%; n-6/n-3: 5,7), E (excesiva en n-3; dieta purificada; 7% aceite mezcla: hígado de bacalao 60% + soja 40%; PUFAs: 3%; n-3: 1,25%; EPA 0,43% y DHA 0,32% n-6/n-3: 1,29) y C (control; alimento balanceado comercial; PUFAs: 1,67%; n-3: 0,08%; n-6/n-3: 19,88). En las crías se evaluó evolución de peso corporal (PC) -desde nacimiento hasta adultez- características de los ciclos estrales -durante pubertad- y al llegar a la adultez, tasa de ovulación inducida y calidad ovocitaria. El PC fue menor durante la lactancia en E *vs* C, D, A, mayor luego del destete en C *vs* D, A, E y mayor a partir del día posnatal 49 en C, E *vs* D, A. El primer estro apareció más tarde en E *vs* C, D, A. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la duración de los ciclos estrales ni en alguna de sus etapas. Tampoco en el recuento de ovocitos, madurez ovocitaria y partenogénesis. El menor PC en E durante la lactancia podría deberse a una alteración en el desarrollo de los conductos mamarios que afecta la cantidad y calidad de la leche que reciben las crías. El retraso en el primer estro de este mismo grupo podría responder a la deficiencia de ácido araquidónico (n-6) provocado por exceso de n-3. En conclusión, el exceso de n-3 retarda el crecimiento corporal y el comienzo de la pubertad sin afectar los ciclos reproductivos y la calidad de las gametas.

356 (150) VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS EN LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA DEPENDIENTE DE LA EXCLUSIÓN DE AMPC EN BOVINOS

Carlos Agustín Isidro Alonso[1]; Luciana Castellano[1]; Claudia Elena Osycka-Salut[1]; Carlos Davio[2]; Silvina Perez Martinez[1]
CEFYBO[1] ININFA[2]

La capacitación espermática (CE) es un proceso necesario para que el espermatozoide (ESP) adquiera capacidad fecundante. La misma implica un complejo diálogo molecular que incluye cambios en la fluidez de membrana, incremento de Ca^{2+} y AMPc y activación de kinasas. En otros tipos celulares, en condiciones fisiológicas y patológicas el AMPc es excluido por proteínas de resistencia a multidrogas (MRPs), en particular MRP4, regulando la homeostasis celular. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que frente a una concentración moderada de bicarbonato en el medio (40 mM), los ESP bovinos sufren un proceso de exclusión de AMPc vía el transportador MRP4 que es crítico para la CE. A su vez, el AMPc extracelular actúa sobre el receptor A1 activando vías de señalización intracelulares que dependen de una PLC y de la adenilato ciclasa soluble. Es por ello que en el presente trabajo nos propusimos ahondar en las vías de señalización involucradas en la CE inducida por bicarbonato o AMPc. Para ello se llevaron a cabo capacitaciones *in vitro* con bicarbonato (40 mM) o AMPc (10 nM), en ausencia o presencia de diferentes inhibidores farmacológicos. Alícuotas de ESP fueron separadas para evaluar el estado de capacitación mediante la técnica de CTC. Por otro lado se extrajeron proteínas totales para evaluar el estado de fosforilación de sustratos de PKA (pPKA), residuos de tirosina (pTyr), o ERK1/2. Los resultados indican que el bicarbonato y el AMPc incrementan pPKA y pTyr, mostrando diferentes perfiles de activación en el tiempo ($p<0,05$). Por otro lado, la inducción de CE por bicarbonato o AMPc estaría modulada por PKC ($p<0,05$). Finalmente, se requeriría de la actividad de ERK1/2 para llevar a cabo la CE inducida por AMPc. Todos estos resultados sugieren que varias vías de señalización podrían activarse simultáneamente por estímulo del AMPc excluido, reforzando su importancia como factor autócrino/parácrino en la CE.

357 (253) POSIBLE ROL DE TRPV-1 Y AQPS EN LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA DE CÉLULAS TROFOBLASTICAS DE PRIMER TRIMESTRE

Julieta Reppetti[12]; Reca Alejandra[2]; Aban Cyntia[3]; Maríana Farina[3]; Alicia E Damiano[12]; Nora A Martínez[2]
Cátedra Biol. Celular y Molecular-FFYB-UBA.[1] IFIBIO Houssay[2] CEFYBO[3]

El receptor de potencial transitorio tipo 1 (TRPV-1) es un canal de calcio que puede ser activado por múltiples estímulos, entre ellos el estrés osmótico. Las acuaporinas (AQPs) son canales que permiten el pasaje rápido de agua a través de la membrana plasmática en respuesta a gradientes osmóticos. En estudios preliminares demostramos la expresión de TRPV-1, AQP3 y 9 en vellosidades coriónicas de primer trimestre de gestación y observamos que el estrés hiperosmolar induce la expresión de estas proteínas. Recientemente se ha vinculado a TRPV-1 y AQPs con procesos de muerte celular. La muerte celular pude transcurrir por tres vías: necrosis, muerte celular programada tipo I (apoptosis) y tipo II (autofagia). Que se active una u otra vía dependerá de diversos factores. El objetivo del presente estudio fue investigar en una línea celular de citotrofoblasto humano de primer trimestre (Swan71) si el estrés hiperosmolar alteraba la viabilidad celular y si en este proceso estaban involucradas las proteínas TRPV-1 y AQPs. Las células fueron cultivadas en condiciones de isoosmolaridad e hiperosmolaridad, en presencia o ausencia de inhibidores de las proteínas en estudio ($HgCl_2$ o Capsazepina). Se determinó la viabilidad celular utilizando el ensayo de MTT, se evaluaron la apoptosis y la autofagia mediante el ensayo de Hoechst, el marcaje de autofagosomas utilizando monodansilcadaverina y la expresión de p53 y caspasa 3 clivada mediante western blot. Al cultivar las células Swan71 en condiciones de hiperosmolaridad evidenciamos una disminución de la viabilidad celular acompañada de un incremento en el número de núcleos picnóticos ($p<0,05$). En estas condiciones observamos un aumento de la expresión de p53 y caspasa 3 clivada ($p<0,05$). Nuestros resultados sugieren que cambios en la osmolaridad del espacio extracelular inducen la muerte celular programada de células de trofoblasto de primer trimestre por mecanismos en los cuales estarían involucrados el TRPV-1 y las AQPs.

358 (283) EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GALECTINA-1 EN FUNCIÓN DEL GRADO DE SEVERIDAD DE LA ENDOMETRIOSIS Y EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE GALECTINA-1 SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS ESTROMALES ENDOMETRIALES EUTÓPICAS

Juan Ignacio Baston[1]; Luciana Ferella[1]; Diego Croci[1]; Analia Ricci[1]; Mariela Bilotas[1]; Rosa Ines Barañao[1]; Jose Javier Singla[2]; Alejandro Gonzalez[3]; Gabriel Rabinovich[1]; Gabriela Meresman[1]
IBYME[1] Hospital de Clínicas José de San Martín[2] Hospital Naval de Buenos Aires Dr Pedro Mallo[3]

Galectina-1 (Gal-1) es una lectina endógena involucrada en la patogénesis tumoral. Basándonos en nuestros trabajos previos que advierten sobre el rol de Gal-1 en la patogénesis de la endometriosis (EDT) experimental, nuestros objetivos fueron: A) evaluar la expresión de Gal-1 en las lesiones endometriósicas y en el endometrio de pacientes con diferentes grados de severidad de EDT y, B) estudiar el efecto de Gal-1 sobre la proliferación de células estromales endometriales (CEE) de pacientes con EDT y controles. Se analizó la expresión de Gal-1 por Western Blot en homogenatos de biopsias de lesiones endometriósicas (n=41) y de tejido endometrial (n=27), obtenidas de pacientes con diagnostico certero de EDT y de pacientes controles (n=27) con diagnóstico de infertilidad por factores tubáricos o miomas. Asimismo, se aislaron y se cultivaron las CEE de ambos grupos de pacientes, sobre las cuales se realizó el silenciamiento transitorio de la expresión génica de Gal-1 mediante un ensayo de interferencia de ARN, luego del cual se determinó la proliferación celular *in vitro* mediante la técnica de MTS. Si bien no se observaron diferencias en la expresión de Gal-1 en el tejido endometrial entre pacientes con EDT vs. controles (p=0.1), sí se observó un aumento significativo de la expresión de Gal-1 en las lesiones endometriósicas en comparación con el tejido endometrial (p=0.03). Específicamente, este aumento se produce en pacientes con un

grado de EDT mínima-leve (p=0.037), dado que en pacientes con EDT moderada-severa la expresión de Gal-1 fue similar en las lesiones y el endometrio (p=0.55). Además, el bloqueo transitorio de la expresión de Gal-1 en las CEE de pacientes con EDT redujo su tasa de proliferación celular en comparación con las CEE de pacientes controles (p=0.006). Estos resultados son novedosos e indican que Gal-1 desempeña un rol importante en la fisiopatología inicial de la enfermedad y avalan su estudio como potencial blanco en la terapéutica de la EDT.

359 (354) EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS Y PROLIFERACIÓN CELULAR EN OVARIOS BOVINOS EN UN MODELO DE PERSISTENCIA FOLICULAR

Eduardo M Belotti; Antonela F Stassi; Pablo U Díaz; Natalia C Gareis; Natalia R Salvetti; Florencia. Rey; Hugo H Ortega
ICIVET-LITORAL

La enfermedad quística ovárica (EQO) es una de las causas de infertilidad en bovinos lecheros y la persistencia folicular es uno de sus signos iniciales. Cambios en el microambiente ovárico de las vacas con EQO pueden alterar el proceso normal de proliferación y apoptosis. El objetivo del trabajo fue evaluar la expresión de proteínas que intervienen en la apoptosis (BCL2, Bax y Caspasa3) y proliferación celular (Ki-67) en ovarios de vacas con persistencia folicular inducida. Se desarrolló un modelo de persistencia folicular mediante el uso de dispositivos intravaginales de progesterona para obtener concentraciones séricas subluteales de dicha hormona (1-2 ng/ml). Se realizó la ovariectomía para la obtención de ovarios con folículos dominantes que persistieron sin ovular por 5 (n=5; P5), 10 (n=5; P10) o 15 días (n=5; P15) posteriores al momento esperado a la ovulación. Los animales controles fueron ovariectomizados en proestro (n=5; C). Se evaluó la expresión de BCL2, Bax, Caspasa3 y Ki-67 mediante inmunohistoquímica en diferentes estructuras foliculares. Bax presentó mayor expresión en células de la granulosa de folículos persistentes del grupo P15 en relación a los antrales controles. La expresión de BCL2 fue mayor en la teca interna de los folículos antrales de P10 que en los folículos atrésicos controles. Caspasa3 mostró mayor expresión en la granulosa de los folículos antrales controles que en los de P15. Hubo un menor porcentaje de proliferación con Ki-67 en la granulosa de los folículos atrésicos controles en relación a los antrales. La teca interna de los antrales controles mostró mayor porcentaje de proliferación en relación a los folículos persistentes de P5 y P15 (p<0,05). Los resultados sugieren modificaciones en los mecanismos de supervivencia de las células ováricas desde el inicio de la persistencia folicular debido probablemente a la modificación del ambiente hormonal, lo que concuerda con lo hallado en la enfermedad de presentación espontánea.

360 (359) EXPRESIÓN DE YAP1 Y TEAD4 EN OVARIOS DE RATONES DIABÉTICOS INDUCIDOS CON ESTREPTOZOTOZINA Y SU RELACIÓN CON LA PÉRDIDA FOLICULAR

Nicolas Fraunhoffer[123]; Analia Meilerman Abuelafia[13]; Ionatan Bergman[3]; María Pilar Bosch[3]; Andres Thompson[3]; Yael Zin[3]; Pablo Lopez Bergami[12]; Marcela Barrios[3]; Alfredo Vitullo[12]
Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnóstico[1] Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas-CONICET[2] Carrera de Medicina-Universidad Maimónides[3]

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) representa el 15% de los casos de DM. A nivel ovárico, se observó que los oocitos de ratones diabéticos presentan un aumento en la apoptosis. La vía Hippo es un regulador clave del crecimiento tisular cuyos principales efectores a nivel nuclear son el coactivador YAP1 y el factor de transcripción TEAD4. Estudios recientes demostraron el rol de la vía Hippo en el desarrollo folicular. El objetivo de este trabajo fue analizar la relación entre la ruta Hippo y la apoptosis durante la pérdida folicular en ovarios de ratones diabéticos. Se utilizaron 25 ratones de la cepa BALB/c. Para la generación del modelo de DM1, los ratones recibieron una inyección diaria de estreptozotocina (STZ) en una dosis de 60 mg/kg por 5 días. 3 ratones diabéticos y 2 controles fueron sacrificados a los días 15, 20, 40, 70 y 80 post-tratamiento. Los ovarios fueron fijados y analizados por IHQ/IF para las proteínas YAP1, TEAD4, Bax, Fas/FasL, Bid Clivado, Caspasa 8 activa y Caspasa 3 activa. Los ovarios de los ratones diabéticos presentaron débil inmunomarcación citoplasmática para YAP1 en células de la granulosa de folículos antrales con una fuerte expresión para Caspasa 3 activa en todos los tiempos estudiados. Esto fue acompañado por una intensa marca para Fas, FasL, Bid Clivado y Caspasa 8 activa a los 15 y 20 días de tratamiento, mientras que en los restantes tiempos prevaleció la inmunomarcación para Bax.TEAD4 se expresó en citoplasma de células de la granulosa de folículos en todos los estadios de maduración, así como también en folículos atrésicos. En el ovario control YAP1 y TEAD4 se expresaron tanto a nivel nuclear y como citoplasmático en células de la granulosa y oocitos de folículos desde el estadio de secundario hasta antral. Estos resultados muestran una posible alteración de la ruta de señalización Hippo en los ovarios de ratones diabéticos inducidos con STZ que podría estar afectando la sobrevida folicular y la fertilidad.

361 (378) EVALUACIÓN DE LA VELOCIDAD DE DESCONDENSACION IN VITRO DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS COMO HERRAMIENTA DIAGNOSTICA EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Vanina Laura Julianelli[1]; Marina Romanato[2]; Gastón Rey Valzacchi[13]; Romina Rolando[3]; Lorena Rodríguez[3]; Gabriela Arenas[1];Camila Galotto[2]; Lucrecia Piñeiro De Calvo[2]; Juan Carlos Calvo[24]
PROCREARTE[1] IBYME[2] Servicios de Urología y Ginecología, Hospital Italiano de Buenos Aires.[3] Departamento de Química Biológica, FCEyN-UBA[4]

La descondensación cromatínica del espermatozoide en el ovocito es requisito para una fertilización exitosa; en el humano ocurriría *in vivo* con participación de glutatión (GSH) y Heparán Sulfato ovocitarios. Resultados previos de nuestro laboratorio sugieren que la velocidad de descondensación cromatínica *in vitro* en presencia de Heparina (análogo de HS) y GSH estaría vinculada con la calidad embrionaria y la tasa de embarazo bioquímico (β+) en Fertilización Asistida (FA). Objetivo: Evaluar el efecto de la velocidad de descondensación *in vitro* de espermatozoides de pacientes infértiles sobre la tasa de embarazo clínico (E, presencia saco embrionario) y la tasa de nacimientos (BB) en FA. Metodología: Parejas infértiles que llevaron a cabo procedimientos de FA, con ovocitos propios (OP) o donados (OD). Sobre la muestra de espermatozoides usada en ICSI se evaluó fragmentación de ADN espermático por TUNEL (TUNEL+>20%) y velocidad de descondensación *in vitro* (D60/D30) con Hep/GSH. Se analizó tasa de β+, tasa de E y tasa de BB.Resultados: Sobre un total de 129 ciclos (población completa, PC) se realizaron 94 transferencias y se obtuvieron 32 β+, 26 E y 16 BB (34%, 28% y 17% por transferencia, respectivamente). Estos tres parámetros fueron semejantes (χ^2, p>0.05) entre los grupos de descondensadores lentos (L, n=50, D60/D30 ≥ 1,48) y rápidos (R, n=44, D60/D30 < 1,48): 36% vs 32% β+, 34% vs 20% E y 20% vs 14% BB. En L, el éxito fue mayor en los ciclos OD (n=19) que en los OP (n=31): 63% vs 23% β+, 53% vs 23% E y 32% vs 13% BB (χ^2, p<0.05). En R (21 OD y 29 OP) no se observó esta diferencia: 27% vs 28% β+, 13% vs 24% E y 13% vs 14% BB (χ^2, p>0.05). En L, BB 0% (0/4) en pacientes TUNEL+ y 23% (7/30) en TUNEL-. En R, BB 33% (2/6) en TUNEL+ y 10% (3/29) en TUNEL-. Conclusiones: Pacientes L tendrían mayor posibilidad de éxito en FA si son TUNEL- o si utilizan OD. La evaluación de D60/D30 podría ser una herramienta útil en la toma de decisiones terapéuticas en FA. SUBSIDIOS: CONICET-ANPCYT-Fundación René Barón

362 (383) EL ÓXIDO NÍTRICO Y LAS PROSTAGLANDINAS RE- GULAN EL EFECTO DEL ÁCIDO LISOFOSFATÍDICO SOBRE LA VASCULARIZACIÓN DEL TROFOBLASTO DE PRIMER TRIMESTRE

Jimena S Beltrame[1]; Ms Sordelli[1]; L Scotti[2]; F Parborell[2]; Am Franchi[1]; Ml Ribeiro[1]
CEFYBO[1] IBYME[2]

El ácido lisofosfatídico (LPA) es un fosfolípido bioactivo que juega un rol fundamental en el establecimiento de la preñez. La implantación del blastocisto en el útero materno requiere de procesos claves como la vascularización. Anteriormente, observamos que el LPA mediante la unión al receptor LPA3 actúa como una molécula pro-implantatoria en el útero de rata, incrementando la longitud transversal de los vasos principales que irrigan los sitios de implantación y la expresión de marcadores de vascularización como IL-10, VEGF y VEGF-R1.El objetivo del presente trabajo fue investigar el rol de mediadores como el óxido nítrico (NO) y las prostaglandinas (PGs) en el efecto del LPA sobre la vascularización en una línea celular de trofoblasto de primer trimestre (HTR-8/SVneo). Las células se incubaron con diferentes concentraciones de LPA (5, 10, 20 y 50 µM) durante 3 y 6h. Se evaluó el grado de vascularización mediante la técnica de formación de túbulos sobre un extracto de matriz de Geltrex.En primer lugar observamos que luego de 6h de incubación, el LPA (10 µM) estimula la formación de túbulos ($p<0.05$) incrementando el largo de los mismos y el número de ramificaciones formadas. La co-incubación de LPA con 1400W (0,1 mM), un inhibidor selectivo de la isoforma inducible de la NOS, o con NS-398 (1 µM), un inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2, revierte el efecto del LPA hasta valores similares al control. Se observó también que el tratamiento con DGPP, un antagonista del LPA3, revierte parcialmente el efecto del LPA.La vascularización del trofoblasto es uno de los eventos cruciales durante la gestación temprana. Nuestros resultados sugieren que el LPA, mediante la interacción con mediadores como el NO y las PGs estimula la vascularización del trofoblasto de primer trimestre y además, este efecto está mediado al menos en parte por el receptor LPA3.

363 (404) ALTERACIONES EN LA VÍA PI3K DE FOLÍCULOS OVÁRICOS CAPACES DE MODULAR LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS IMPLICADAS EN LA SÍNTESIS DE ESTEROIDES EN VACAS CON ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA

Natalia Carolina Gareis; Emilia Huber; Gustavo Juan Hein; Fernanda Mariel Rodríguez; Valentina Trionfini; Hugo Héctor Ortega; Natalia Raquel Salvetti; Florencia Rey
Lab de Biología Celular y Molecular Aplicada ICIVET Litoral UNL CONICET

La enfermedad quística ovárica (EQO) bovina representa uno de los trastornos reproductivos más frecuentes en los sistemas intensivos de producción de leche. El desarrollo, la maduración folicular y la esteroidogénesis son procesos claves para el funcionamiento ovárico y esta última se halla alterada en la EQO. Nos propusimos evaluar la expresión génica y proteica de enzimas que intervienen en la síntesis de esteroides capaces de ser reguladas por una de las vías de señalización de insulina (vía PI3K). Se analizaron muestras obtenidas mediante ovariectomía provenientes de animales con EQO espontánea (n=8) y de animales controles en proestro (n=8). Se utilizaron folículos antrales pequeños, medianos, grandes y quistes espontáneos para evaluar las moléculas de interés por PCR en tiempo real. La expresión proteica se evaluó mediante inmunohistoquímica indirecta. En el análisis de la vía de señalización de insulina, se determinó una menor expresión proteica de PI3K y AKT en células de la teca de quistes respecto a folículos antrales control ($p<0,05$), siendo similar en células de la granulosa. La expresión proteica de mTOR en células de la teca fue similar en todos las categorías foliculares y se detectó una menor expresión en células de la granulosa de quistes respecto a folículos antrales control ($p<0,05$). En la evaluación de enzimas relacionadas con la síntesis de esteroides se demostró que la expresión génica y proteica de StAR fue similar en células de la granulosa y teca de todas las categorías foliculares evaluadas ($p>0,05$). La expresión proteica de 3ß-HSD y cyp19 fue mayor en células de la granulosa de quistes respecto a los folículos antrales control ($p<0,05$) y la expresión de cyp17 fue mayor en células de la teca de quistes respecto a controles. Los resultados sugieren una alteración en la señalización de insulina que podría modular la expresión de enzimas involucradas en la síntesis de hormonas esteroides y con ello favorecer el desarrollo de la enfermedad

364 (409) EXPRESIÓN DE TRANSCRIPTOS ALTERNATIVOS DE LOS RECEPTORES DE GONADOTROFINAS EN OVARIOS DE BOVINOS CON ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA

Belkis E. Marelli; Juan I. Failla; Ayelen N. Amweg; Pablo U. Díaz; Florencia Rey; Natalia R. Salvetti; Hugo H. Ortega
ICIVET-Litoral

Una disfunción a nivel del folículo ovárico puede causar una alteración en el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, siendo una de las posibles causas del desarrollo de la enfermedad quística ovárica (EQO) en bovinos. Los receptores de gonadotrofinas LH (LHR) y FSH (FSHR) cumplen funciones fundamentales en la regulación del desarrollo folicular, por lo que es posible su asociación directa con la patogénesis de la EQO. La diversidad de transcriptos alternativos de dichos receptores presupone un papel significativo en la regulación funcional de los mismos. En este contexto, el objetivo de nuestro trabajo fue analizar la expresión de transcriptos alternativos de LHR y FSHR en folículos quísticos de bovinos con EQO. Para ambos receptores se diseñaron dos pares de cebadores, uno que permite la amplificación de una región del dominio extracelular (denominado dominio A), y el otro para la amplificación de un fragmento de los dominios transmembrana e intracelular (denominado dominio B). El patrón de expresión de las distintas isoformas fue caracterizado mediante PCR de punto final en células de teca y granulosa de folículos antrales medianos y grandes de animales controles (n=15) y de quistes espontáneos de animales con EQO (n=15). Para LHR se identificaron amplicones de 689 pb (LHR-A1, dominio A completo), 614 pb (LHR-A2), 898 pb (LHR-B3, dominio B completo), 817 pb (LHR-B4), 633 pb (LHR-B5), y 556 pb (LHR-B6). Para FSHR se detectaron amplicones de 492 pb (FSHR-A1, dominio A completo), 345 pb (FSHR-A2), 725 pb (FSHR-B3, dominio B completo), y 542 pb (FSHR-B4). En todos los casos, excepto para FSHR-B4 y LHR-B5, se observó un patrón de expresión diferencial en folículos controles en relación a folículos quísticos ($p < 0,05$). Estos resultados sugieren una respuesta alterada a gonadotrofinas asociada a la EQO que podría explicar ciertos aspectos de la funcionalidad folicular de animales con la enfermedad y la falta de respuesta a tratamientos hormonales.

365 (452) VIP REGULA LA MIGRACIÓN E INVASIÓN DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS EN FORMA AUTOCRINA VÍA VPAC2/PKA/CRE E INHIBE LA SÍNTESIS DE MEDIADORES PRO-INFLAMATORIOS EN MACRÓFAGOS

Daiana Marina Vota[1]; Daniel Paparini[1]; Vanesa Hauk[1]; Ayelén Toro[2]; Fátima Merech[1]; Rosanna Ramhorst[1]; Cecilia Varone[2]; Claudia Pérez Leirós[1]
Laboratorio de Inmunofarmacología, Dpto. Química Biológica, IQUIBICEN– CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UBA[1] Laboratorio de Fisiología Molecular Placentaria, Dpto. Qca. Biológica, IQUIBICEN– CONICET, FCEN-UBA[2]

El proceso de placentación requiere de la migración de células trofoblásticas (Tb) y su diferenciación a un perfil invasivo en un microambiente anti-inflamatorio. Previamente describimos el efecto del péptido intestinal vasoactivo (VIP), un péptido pleiotrópico endógeno, en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica en la gestación temprana. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de VIP endógeno sobre la migración e invasión de Tb de primer trimestre (líneas Swan-71 y HTR-8), la vía de señalización involucrada y su papel en la inducción de señales anti-inflamatorias en monocitos/macrófagos humanos. La migración de Tb se evaluó por ensayos de cierre de herida en monocapa y su capacidad invasiva mediante dispositivos tipo transwells cubiertos con matrigel. Tb fueron transfectadas con plásmido VPAC2 o CRE-Luciferasa y normalizadas con GFP o beta-gal respectivamente. El silenciamiento de VIP se realizó transfectando Tb con siRNA VIP por 72 h, comparando con uno no relevante (SCRBL). Tb transfectadas con CRE-luc muestran una inducción dosis dependiente de la actividad de CRE por VIP y una disminución de los niveles basales en presencia de un

antagonista de VIP sugiriendo un efecto autócrino del VIP (VIP vs Basal (B); Ant vs B; p<0,05). La inhibición de PKA bloquea la activación de CRE por VIP demostrando su participación en la activación por VIP/VPAC. La sobre-expresión de VPAC2 aumenta la migración y la invasión de Tb indicando su participación en estos procesos (% migración: V.Vacío: 11±2,4; VPAC2: 17,1±2,0; P<0,05). Por otro lado el silenciamiento del VIP en Tb disminuyó su migración (siRNAVIP vs siRNASCRBL, p<0,05) y se observó una menor producción de mediadores pro-inflamatorios en monocitos/macrófagos luego de co-cultivo con Tb VIP deficientes (p<0,05). Los resultados apoyan la contribución del sistema VIP/VPAC2 de células Tb a la placentación estimulando de manera autócrina la migración e invasión de Tb y contribuyendo a la homeostasis inmunológica

366 (477) LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE PROGESTERONA EN LAS CÉLULAS DEL CÚMULUS ALTERA LA MIGRACIÓN ESPERMÁTICA EN EL OVIDUCTO Y RESULTA EN MENORES PORCENTAJES DE FERTILIZACIÓN

Florenza A. La Spina; Ana Romarowski; Lis Del C. Puga Molina; Guillermina M. Luque; Maríano G. Buffone
IBYME

Los espermatozoides de mamífero son capaces de fertilizar luego de atravesar un proceso denominado capacitación dentro del tracto reproductor femenino. Esto les permite desarrollar la capacidad para realizar la exocitosis acrosomal (EA), la cual es fundamental para penetrar la zona pelúcida (ZP) del ovocito. Antecedentes previos han demostrado que el espermatozoide que llega al sitio de fertilización realiza la EA antes de contactar con la ZP y a pesar de que diferentes estimulantes de la EA fueron reportados, el o los inductor fisiológico aún no ha sido identificado/s. En este contexto, toma protagonismo la progesterona, secretada por las células del cúmulus y postulada como un inductor de la EA pero también como una importante cooperadora en la quimiotaxis dentro del oviducto. Objetivo: Estudiar la participación de la progesterona en la EA y su contribución a la fertilización tanto in vitro como in vivo. Metodología:Se utilizaron ratones transgénicos que expresan las proteínas EGFP en el acrosoma y DsRed2 en mitocondrias (Acr3-EGFP/su9-DsRed2) permitiendo evaluar el estado acrosomal de los espermatozoides y su localización dentro del oviducto por microscopía de epifluorescencia con sistema live imaging. La síntesis de progesterona se inhibió mediante el uso de Trilostante, un inhibidor especifico de la 3BHSD1. Resultados:1) La incidencia de EA luego de la inducción con progesterona fue incrementándose de una manera dosis dependiente; 2) El trilostante inhibió la síntesis de progesterona por la células del cumulus, tanto in vivo como in vitro; 3) La inhibición de la síntesis de progesterona disminuyó significativamente la fertilización in vivo, observándose importantes alteraciones en el proceso de migración espermática a través del oviducto. Conclusión: La progesterona es esencial para que los espermatozoides murinos puedan migrar a través del oviducto hacia el sitio de fecundación.

367 (502) EL ACIDO LISOFOSFATIDICO MODULA PROCESOS CLAVES PARA LA IMPLANTACIÓN EN LA INTERFASE MATERNO-FETAL

Micaela Sordelli[1]; Jimena Beltrame[1]; Maximiliano Cella[1]; Udo Markert[2]; Ana María Franchi[1]; María Laura Ribeiro[1]
CEFYBO[1] Universidad Hospital de Jena, Alemania.[2]

Imtroducción: La invasión del trofoblasto hacia el endometrio es crítica para la implantación. El trofoblasto a término sintetiza ácido lisofosfatídico (LPA), un fosfolípido bioactivo que participa de diversos eventos reproductivos, mayormente a través de su unión al receptor LPA3. La concentración de LPA aumenta en el suero de mujeres embarazadas conforme progresa la gestación y la placenta expresa lyso-PLD, una de las principales enzimas que participa de la síntesis de LPA. Previamente, en nuestro laboratorio observamos que el LPA actúa como una molécula pro-implantatoria regulando la producción de prostaglandinas (PGs) en el útero de rata preñada durante la ventana de implantación. Objetivo: Investigar el rol del LPA sobre las células del trofoblasto de primer trimestre presentes en la interfase materno-fetal. Metodología: Células de trofoblasto humano de primer trimestre (línea HTR-8/SVneo) se incubaron con LPA (50 µM) en presencia o ausencia de inhibidores de la producción de PGs y se determinó la migración (ensayo de herida) e invasión celular (ensayo con insertos en Matrigel). Resultados: La incubación con LPA estimula la migración (18hs, p<0.05) y la invasión (24hs, p<0.01) del trofoblasto de primer trimestre. El tratamiento con indometacina (10 nM), un inhibidor no selectivo de las ciclooxigenasa-1 y 2, o con NS-398 (10 nM), un inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2, revierte el efecto estimulatorio del LPA sobre la migración. Además, observamos que el LPA aumenta la producción de PGE2 (48hs, p<0.001, RIA), y que las isoformas 1 y 2 de la ciclooxigenasa se localizan en el citoplasma de las células HTR-8/SVneo (inmunocitoquímica). Conclusiones: Estos resultados sugieren que el LPA regula dos de las principales funciones del trofoblasto necesarias para garantizar el éxito de la gestación. En particular, el LPA incrementa la migración a través de un aumento en la producción de PGE2 proveniente de la vía de la ciclooxigenasa-2.

368 (506) ALTERACIONES EN EL PROCESO DE PLACENTACIÓN MURINA ASOCIADAS A UNA DEFICIENCIA DE VIP POR CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS GIGANTES

Vanesa Hauk[1]; Daiana Vota[1]; Guillermina Calo[1]; Lucila Gallino[1]; María Emilia Ferro[1]; Rosanna Ramhorst[1]; James Waschek[2]; Claudia Perez Leiros[1]
Laboratorio de Inmunofarmacología-Departamento de Química Biológica - IQUIBICEN - CONICET[1] The David Geffen School of Medicine, University of California, Los Angeles, USA[2]

El proceso de invasión del estroma decidual por células trofoblásticas, indispensable durante la constitución de la interfase materno-placentaria, se asocia a bajas concentración de oxígeno y nutrientes en condiciones fisiológicas de estrés. La autofagia es un proceso metabólico caracterizado por la degradación de organelas para el mantenimiento de la homeostasis celular en condiciones estresantes. El péptido intestinal vasoactivo (VIP) es un péptido pleiotrópico con efecto vasodilatador, anti-inflamatorio y trófico por activación de receptores VPAC1/VPAC2. En trabajos previos demostramos que la gestación en ratones deficientes en VIP se asocia a menor número de crías al nacer, mayor tiempo entre gestaciones y distribución asimétrica de los sitios de implantación. El objetivo de este trabajo es investigar la relevancia del sistema VIP/VPAC endógeno en el fenotipo invasivo de las células trofoblásticas gigantes (TGC). Para esto utilizamos cruzas de hembras WT con machos WT o VIP KO. Al día 8,5 de gestación se aislaron los sitios de implantación para determinar la expresión de distintos marcadores de inflamación y placentación por RT-qPCR o las TGC fueron aisladas por microdisección por captura láser (LCM). Los sitios de implantación de la cruza WT x KO presentaron una disminución en la expresión de IL-10 y aumento de HIF1-a, VEGF, MMP-9 (UA: 0,46±0,19 WTxWT vs 8,5±3,6 WTxVIP(-/-); p<0,05), entre otros. Las células trofoblásticas deficientes en VIP presentan una disminución en el patrón puntillado de LC3, marcador característico de la vía autofágica. Al aislar las TGC por LCM encontramos que las TGC deficientes en VIP presentan un incremento en la expresión del receptor VPAC2, de HIF-1a y una disminución en la expresión de MMP-9 (p<0,05). Estos resultados sugieren la participación de VIP en la regulación de mediadores asociados al fenotipo invasivo y en la inducción de autofagia por células TGCs como vía de supervivencia en condiciones de estrés.

369 (531) CARACTERIZACIÓN DEL ARRESTO DE LA ESPERMATOGÉNESIS EN UN CUADRO DE INFLAMACIÓN TESTICULAR E INFERTILIDAD EN LA RATA

Cinthia Soledad Mendez; María Eugenia Ferreiro; Cristian Marcelo Sobarzo; Livia Lustig; Patricia Verónica Jacobo; María Susana Theas
INBIOMED

La orquitis autoinmune experimental (OAE) es un modelo de infertilidad asociado a un infiltrado linfomonocitario intersticial

cuyos productos de secreción (óxido nítrico (ON), TNF-α e IL-6) participan en el daño de los túbulos seminíferos (TS) provocando alteraciones de la barrera hemato-testicular, apoptosis y descamación progresiva de las células germinales (CG) post-meióticas. En la fase severa del cuadro sólo persisten las CG pre-meióticas (espermatogonias y espermatocitos preleptoteno) y de Sertoli y la espermatogénesis no progresa. El objetivo de nuestro trabajo fue evaluar si la alteración del ciclo celular de las CG pre-meióticas y el ON están involucrados en la detención de la espermatogénesis. Para ello determinamos la proliferación de las espermatogonias mediante la incorporación de bromo-deoxi-uridina (BrdU) en ratas macho Wistar adultas normales (grupo N) e inmunizadas para desarrollar OAE (grupo E). Las ratas fueron sacrificadas a los 50 días (d) (OAE focal) y 70d (OAE severa) de la primera inmunización. En la OAE el% de TS con espermatogonias BrdU+, evaluado por inmunofluorescencia (IF) en cortes de testículo, disminuyó significativamente a los 70d (50d N: 53.31±3.85%, E: 47.24±8.91; 70d N: 61.80±1.63, E: 28.47±2.74*, p<0.01 vs N70d, media±ESM). Por citometría de flujo también observamos una disminución del% de espermatogonias BrdU+ (aprox 55.20%) en la OAE severa vs N. En ratas N la inyección intratesticular del dador de ON, DETA-Nonoato (D-NO) disminuyó significativamente el% de TS con espermatogonias BrdU+ vs solución fisiológica (SF) determinado por IF en cortes de testículo (SF: 63.87±1.93, D-NO (200μM): 54.08±4.44, D-NO (50μM): 42.03±2.98* p<0.05). Demostramos que en la OAE el ciclo celular se arresta como consecuencia de la disminución de la proliferación de las espermatogonias y que el ON podría estar involucrado en la detención del ciclo en dichas células.

370 (535) GRELINA Y PPARγ EN EL OVARIO HIPERANDROGENIZADO

María Florencia Heber; Leandro Martín Velez; Giselle Adriana Abruzzese; Alicia Beatriz Motta
CEFYBO

Grelina (GHR) es una hormona peptídica que regula el metabolismo de la glucosa y está implicada en el desarrollo del síndrome metabólico y patologías cardiovasculares. Se ha demostrado que grelina se encuentra disminuida en condiciones de obesidad, diabetes tipo 2 y Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP). Existen evidencias de que GHR modula el metabolismo lipídico regulando genes adipogénicos como el receptor nuclear activado por proliferadores peroxisomales gamma (PPARγ). Recientemente se ha demostrado que GHR es un regulador básico del eje reproductivo actuando a nivel gonadal y central. Y que además del estomago se sintetiza en el ovario. Previamente observamos en un modelo murino de hiperandrogenización prenatal (HP) sobrepeso, anovulación, bajos niveles de GHR circulante y acumulación lipídica en el ovario. Objetivo: Evaluar la posible asociación entre GHR y el sistema PPARγ en el ovario y el efecto de la HP. Ratas preñadas Sprague-Dawley se inyectaron entre los días 16 a 19 de gestación con 2 mg de testosterona ó aceite. Las crías hembras se pesaron y sacrificaron a los 90 días de edad los grupos son control (C) y HP. Se estudió la expresión génica de GHR, su receptor y el sistema PPAR en el ovario mediante PCR en tiempo real. Resultados: La expresión de GHR fue menor en el grupo HP (0.12±0.08 UA) con respecto al C (0.7±0.07 UA) p<0.01, la expresión del receptor de GHR fue mayor para el grupo HP vs el C. (C: 0.69±0.18 UA vs. HA: 1.71±0.18 UA; p<0.01). La expresión de PPARγ fue mayor en el grupo HP con respecto al control (C: 1.55±0.7UA vs HP: 3.39±0.2UA; p<0.01) al igual que su activador PGC1α (C: 0.71±0.25UA vs. HP: 2.22±0.25 UA; p<0.01). Conclusiones: Existe una asociación directa entre GHR y el sistema PPAR, que se encuentra sobreexpresado/activado en el grupo HP que podría estar induciendo la disfunción ovárica.

371 (540) DETERIORO DEL TEJIDO UTERINO EN UN MODELO MURINO DE POLIQUISTOSIS OVÁRICA

Silvana Rocio Ferreira; María Florencia Heber; Alicia Beatriz Motta
CEFYBO

El Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP) es una de las endrocrinopatías reproductivas y metabólicas más frecuente en mujeres en edad fértil. A nivel reproductivo, las mujeres con SOP presentan bajas tasas de implantación por un deterioro de la funcionalidad uterina. La etiología es aún desconocida, pero la hipótesis actual sostiene que durante la gestación un exceso de andrógenos genera un ambiente intrauterino desfavorable, lo que induce reprogramación fetal ocasionando consecuencias en la vida adulta del feto en desarrollo. Los receptores nucleares activados por proliferadores peroxisomales (PPAR gama) modulan la receptividad uterina. Objetivo: Establecer el estado oxidante/antioxidante e inflamatorio y la expresión génica de PPAR gama en el tejido uterino en la etapa adulta (90 días) en ratas hiperandrogenizadas prenatalmente (HP). Ratas preñadas Sprague-Dawley se inyectaron con 2mg de testosterona ó aceite entre los días 16 a 19 de gestación, se utilizaron las crías hembras (N= 10 animales/grupo) que se sacrificaron a los 90 días de edad (Grupos HP y control (C)). Resultados: HP indujo un ambiente intrauterino oxidante dado por un aumento en la peroxidación lipídica (LP) (C: 90,5±36,1 vs HP: 151,4±34,6 μM/mg proteína) p<0,01, mientras que el glutatión se encontraba disminuido (C: 24,2±9,2 vs HP: 13,7±2,1 μM/mg proteína) p<0,05. Con respecto al estado pro-inflamatorio, en el grupo HP se ve un aumento de PGE (293,7±238,3 pg/mg tejido) con respecto a C (33,1±21,7pg/mg tejido) p□0,05. La expresión génica evaluada por real time PCR de PPAR gama se encuentra disminuida en el grupo HP con respecto al grupo C (C: 1,92±0,64 vs HP: 0,46±0,16 U.A) p□0,05, así como la de su coactivador PGC1 (C: 0,8±0,49 vs HP: 0,4±0,16 U.A) La HP induce un estado pro-oxidante y pro-inflamatorio y altera la expresión de PPAR gama en el tejido uterino que se evidencia en la etapa adulta.

372 (559) EL AUMENTO DE TEMPERATURA DURANTE LA CAPACITACIÓN DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS ESTIMULA LA HIPERACTIVACIÓN Y FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS EN TIROSINA

Guillermina María Luque; Lis Del Carmen Puga Molina; Ana Romarowski; Florenza Antonella La Spina; Maríano Gabriel Buffone
IBYME

Los espermatozoides de mamífero no poseen capacidad fértil al momento de ser eyaculados. La adquieren durante el tránsito por el tracto reproductor femenino en un proceso denominado capacitación. Durante el mismo ocurren cambios bioquímicos en el espermatozoide que le permiten adquirir funciones esenciales como la hiperactivación (HA) y la capacidad de realizar la exocitosis acrosomal. La HA espermática consiste en un cambio en el patrón de movimiento resultando en uno vigoroso, de gran desplazamiento lateral de la cabeza, con incremento en la longitud y amplitud del movimiento del flagelo. En estudios preliminares, observamos que un aumento en la temperatura de incubación provoca un marcado incremento en los niveles de HA. Por lo tanto, nos propusimos estudiar cuáles son las bases moleculares que conllevan a este cambio. Para ello incubamos espermatozoides humanos a 37ºC o 40ºC durante la capacitación y observamos mediante el análisis por CASA, un incremento en el porcentaje de espermatozoides hiperactivados a partir de los 30 min de capacitación a 40ºC en comparación con aquellos incubados a 37ºC. Este incremento correlacionó con un aumento en los niveles de proteínas fosforiladas en tirosina, sin variaciones en la fosforilación de sustratos de PKA. Asimismo los niveles de HA observados en espermatozoides humanos capacitados a 40ºC son similares a los provocados por la estimulación farmacológica de la vía AMPc/PKA utilizando dbAMPc/IBMX. A partir de estos resultados podemos concluir que el aumento de temperatura durante la capacitación produce un incremento en la HA que estaría relacionado con un aumento en la activación río abajo de la vía AMPc/PKA mediante el estímulo de la fosforilación de proteínas en tirosina. Estos resultados son relevantes ya que el aumento de la temperatura durante la capacitación podría ser utilizado para tratar ciertos casos de infertilidad masculina en combinación con técnicas de fertilización *in vitro* e inseminación intrauterina.

373 (571) ECLAMPSIA Y SINDROME DE HELLP: DOS ALTERNATIVAS GRAVES EN EL ESPECTRO DE LAS PATOLOGÍAS DE HIPERTENSIÓN GESTACIONAL. ESTUDIO COMPARATIVO

Ana Irene Corominas[1]; Silvia Balconi[1]; María Ortiz[1]; Natalia Szpilbarg[2]; Nora Martinez[2]; Alicia E Damiano[23]
Hospital Posadas[1] IFIBIO HOUSSAY[2] Cat. Biol. Celular y Molecular- FFyB-UBA[3]

La eclampsia (E) es la forma más grave de preeclampsia (PE), y se caracteriza por convulsiones, hipertensión, proteinuria y edema. El Síndrome HELLP una complicación grave de PE caracterizada por anemia hemolítica microangiopática, disfunción hepática y trombocitopenia. Ambas se encuentran entre las causas principales de muerte materna y fetal y pueden desencadenarse preparto (preP), intraparto (intraP) o postparto (postP) y su fisiopatología no es conocida.Nuestro objetivo fue estudiar la incidencia de E y HELLP en la población de gestantes atendidas entre el 2006-2010 en el Hospital Posadas, con el fin de seleccionar factores de riesgo en dicha población. Se realizó un estudio descriptivo-cuantitativo, mediante relevamiento y análisis de información de fuentes secundarias. Se estudiaron todos los partos atendidos durante el año 2010 y una selección de casos con diagnóstico de E y HELLP ocurridos entre 2006-2010. En los 4845 partos atendidos durante el año 2010 las prevalencias fueron 2.09% PE, 0.24% E y 0.11% HELLP. La distribución de edades maternas en el grupo de pacientes con E comparado con PE presentó un corrimiento hacia edades menores (24 vs 20 años) mientras que las que desarrollaron HELLP (26 años) tuvieron un corrimiento hacia edades mayores, $p<0.05$. Un 37% de los casos de E se manifestó intraP o postP, mientras que el 100% de los casos de PE y el 86% de HELLP fueron preP. Un alto porcentaje de PE y HELLP presentaron sobrepeso u obesidad. Con respecto a los recién nacidos, la tasa de prematurez en HELLP fue de 74.3%, E 52.3%, PE 45.9%; y el porcentaje de bajo peso al nacer (<2500g) fue de 66.7% para HELLP, 51.2% para E, y 38.9% para PE.Esto sugiere que la E y el HELLP serían entidades diagnósticas con distinto grupo de pacientes susceptibles y con un perfil de riesgo diferencial para cada una. La obesidad y la edad materna podrían influir en el desencadenamiento de una u otra patología. El HELLP presentaría un mayor riesgo para el neonato.

374 (580) DESARROLLO DE UN MODELO MURINO DE RESTRICCIÓN DEL CRECIMIENTO INTRAUTERINO INDUCIDO POR GLUCOCORTICOIDES. EFECTO DE LA DEXAMETASONA SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LA PLACENTA

Julieta Aisemberg; María Victoria Bariani; Ana Paula Domínguez Rubio; Ana María Franchi
CEFYBO

La restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) está asociada a un mayor riesgo de morbi-mortalidad neonatal y al desarrollo en la adultez de un grupo de enfermedades que incluyen diabetes tipo II, hipertensión y obesidad entre otras. Una causa identificada es la exposición excesiva a glucocorticoides (GC), ya sea por estrés materno o por administración exógena de GC como norma terapéutica ante riesgo de parto prematuro. Patologías como RCIU y preeclampsia están directamente relacionadas con disfunción placentaria. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un modelo murino de RCIU por administración de GC y determinar el compromiso de la placenta en esta patología. Se realizó una curva con dexametasona (Dx: 0.1, 0.5, 2, 3, 5 y 8 mg/kg, s.c.) administrándola en distintos días de gestación (14, 15 y 16) a ratones de la cepa BALB/c y se evaluó el peso de las crías en el día postnatal 1. La dosis de 8 mg/kg de Dx dada en los días 14 y 15 de gestación produce RCIU (crías con peso por debajo del percentil 10). Un 30% de los controles tienen al menos una cría con RCIU. El 87,5% de las madres tratadas con Dx presenta crías con bajo peso, con una incidencia del 70% dentro de la camada. Estas crías muestran una reducción de peso del 26% en el día postnatal 1, que ya se observa en el día 18 de gestación, además de disminución del peso de la placenta (18%). No hay cambios en la ingesta materna pero si una menor ganancia de peso en las hembras tratadas con Dx ($p<0,01$). Al evaluar los niveles de ARNm en la placenta encontramos aumento del factor de crecimiento endotelial vascular VEGF ($p<0,05$) y disminución del factor de crecimiento placentario PGF ($p<0,05$) y del transportador de glucosa GLUT3 ($p<0,05$). La administración de Dx durante el último tercio de la gestación en el ratón induce RCIU. La sobreexposición a GC afecta la fisiopatología placentaria alterando la expresión de intermediarios de la función vascular y del transporte de glucosa al feto.

375 (590) EVALUACIÓN DE IL1β E IL4 EN SUERO Y LÍQUIDO FOLICULAR DE BOVINOS TRATADOS CON ADENOCORTICOTROPINA (ACTH) DURANTE EL PERIODO PREOVULATORIO

Eduardo M Belotti; Antonela F Stassi; Natalia C Gareis; Ulises S Notaro; Florencia Rey; Hugo H Ortega; Natalia R Salvetti
ICIVET-Litoral

La ovulación es un proceso análogo a la inflamación pero sumamente controlado, siendo las citoquinas factores determinantes en este mecanismo. Junto con células del sistema inmune, las células de la granulosa y de la teca secretan las citoquinas en el ovario. La enfermedad quística ovárica (EQO) constituye una de las causas de infertilidad en bovinos lecheros que tiene como uno de sus componentes la falla en la ovulación que ocasiona la persistencia folicular. Una alteración en los mediadores de la inflamación podría contribuir a la patogenia de la EQO. Nuestro objetivo fue evaluar la concentración de las interleuquina (IL) 4 e IL1β en líquido folicular (LF) de los folículos dominantes y suero de vacas sometidas a un modelo de estrés. Se generó un modelo experimental en bovinos mediante la aplicación de ACTH intramuscular cada 12 horas durante cuatro días previos al momento esperado para la ovulación. Se tomaron muestras de sangre y se realizó la ovariectomía para la obtención de tejido y líquido folicular de folículos dominantes (n=5). Los controles fueron ovariectomizados en proestro (n=5; C). Sobre LF y suero se determinó, la concentración de IL4 e IL1β mediante ELISA. El LF del grupo tratado con ACTH mostró una tendencia a disminuir la concentración de IL4 con respecto al grupo C ($p=0.75$), mientras que en suero los niveles fueron similares en ambos grupos ($p>0.05$). No se encontraron diferencias en la concentración de IL1β en LF y suero entre ambos grupos ($p>0.05$). Estos resultados contribuyen al análisis de alteraciones en los mecanismos inflamatorios asociados a la ovulación en animales sometidos a estrés. La falla en el mecanismo ovulatorio podría estar implicada en la persistencia de los folículos que se observa en animales que cursan con EQO de manera espontánea. La IL4 actúa a través del receptor de IL4 por lo que sería fundamental evaluar la expresión del receptor como así también la expresión de otras citoquinas involucradas en el proceso de ovulación.

376 (597) LA PROGESTERONA REVIERTE EL INCREMENTO DEL ÓXIDO NÍTRICO INDUCIDO POR LIPOPOLISACÁRIDO A TRAVÉS DE UN MECANISMO INDEPENDIENTE DEL RECEPTOR NUCLEAR DE PROGESTERONA

Manuel Luis Wolfson; Julieta Schander; María Victoria Bariani; Fernando Correa; Ana María Franchi
CEFYBO

Las infecciones del tracto genital por bacterias gram negativas son una de las mayores complicaciones en los embarazos humanos. En nuestro laboratorio demostramos que la administración de LPS a ratones a los 7 días de gestación induce reabsorción embrionaria a las 24hs, y el óxido nítrico (NO) cumple un papel fundamental. Además, demostramos que la progesterona (P) tiene un efecto protector sobre los efectos inflamatorios inducidos por el LPS. El objetivo de este trabajo fue estudiar si la administración de P modula el aumento de la producción de NO inducida por LPS en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de ratones preñados y no preñados. En ratones preñados en día 7 de gestación la administración de LPS indujo un aumento en los niveles de NO producido por las PBMC, el cual fue revertido

con la administración de P. La administración de LPS a ratones no preñados produjo un aumento en la producción de NO de las PBMC, el cual fue abolido con la administración de P. El mismo efecto se observó cuando se analizaron los niveles de la NOsintasa inducible (NOSi). Para analizar si el efecto de la P es a través de sus propios receptores (PR) utilizamos RU486, un antagonista de los PR. Al co-administrar RU486 y P, el efecto de la P sobre los niveles de la NOSi desaparece. Como el RU486 además de antagonista de los PR es antagonista de los receptores de glucocorticoides (GR), utilizamos un antagonista específico de los PR, lonaprisan. Al co-administrar lonaprisan y P, no se revirtió el efecto de la P, sugiriéndonos que la P podría estar actuando a través de los GR. Asimismo la dexametasona, agonista de los GR, mimetizó el efecto protector de la P sobre el aumento de la expresión de la NOSi en las PBMC de ratones no preñados desafiados con LPS. A través de RT-PCR mostramos que las PBMC expresan los GR. Estos resultados sugieren que la progesterona protege del incremento en la producción de NO inducida por LPS a través de un mecanismo independiente de los PR.

377 (620) MODIFICACIONES EN LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA PLACENTARIA Y ENCEFÁLICA PRODUCIDAS POR DIETAS EXCEDIDAS EN ÁCIDOS GRASOS OMEGA 6

María Del Rosario Solís[1]; Santiago Bianconi[1]; Graciela Stutz[1]; María Emilia Santillán[2]
Cátedra de Fisiología Humana, FCM, UNC.[1] Facultad de Medicina, Univ. Nac. de La Rioja[2]

El ácido graso (AG) ω3 docosahexaenoico (DHA) es fundamental para el desarrollo del sistema nervioso central y la retina, durante gestación. Debido a la alimentación occidental rica en ω6, nos propusimos evaluar efectos de dietas excedidas en ácido linoleico (ALω6) sobre la composición lipídica de placentas (P) y encéfalos fetales (EF) de ratón.Hembras con tapón mucoso vaginal (día gestacional 0,5=DG0,5; n=75), asignadas a 3 grupos: control (C, dieta comercial, AL=1,6%;n=25) o C con 10% de aceites de soja o girasol (S, AL=6,68%; n=24 y G, AL=7,68%;n=26, respectivamente). Extractos lipídicos de P y EF (Fölch) al DG12,5 y 16,5. Cromatografía gaseosa. Estadística: ANOVA, Chi-cuadrado, Kruskall-Wallis. $p \leq 0,05$ EF: Los 3 grupos con gran cantidad de AG saturados, superior en G al DG 12,5 y en C al DG 16,5 ($p \leq 0,05$). Mayor contenido de AG insaturados en C y S al DG 12,5 ($p \leq 0,05$). Importante tendencia a mayor contenido de ω3 en S y C, con predominio de docosapentaenoico sobre eicosapentaenoico (EPA) y DHA. Contenido superior de ω6 en hembras tratadas al DG 12,5 y 16,5 ($p \leq 0,05$). Predominó AA en hembras tratadas, estabilizándose en los 3 grupos al DG 16,5. Al DG 12,5 menos ω9 y ác. oleico en las hembras tratadas, $p \leq 0,05$. P: DG12,5: saturados: mayor en G ($p \leq 0,05$); insaturados: mayor en C y S ($p \leq 0,05$). Elevadas concentraciones de ω6 totales, mayores en G y S vs C, a expensas de un incremento de AA ($p \leq 0,05$). P y EF: escasa cantidad de EPA en hembras tratadas, $p \leq 0,05$ vs C. P vs EF: significativa disminución de ω3 totales y ALA en C vs G y S.El gran contenido de AG saturados en ambos tejidos se debería a su provisión por la dieta, al igual que el de AL, aumentado en G y S, que explicaría más AA en estos grupos. Ác. Oleico elevado en S y C favorecería el desarrollo cerebral. El contenido de ALA en EF no varió, posiblemente por la escasa presencia de este AG en las dietas empleadas. ALA, EPA y DHA fueron muy bajos a nivel P, apoyando la prioridad de su transporte transplacentario.

378 (547) APOPTOSIS E INFLAMACIÓN EN UN MODELO DE FOLICULOGÉNESIS ALTERADA POR ANDRÓGENOS

Leandro Martin Velez; Silvana Rocio Ferreira; Giselle Abruzzese; María Florencia Heber; Alicia Beatriz Motta
CEFYBO

El hiperandrogenismo en mujeres en edad reproductiva está fuertemente asociado a la anovulación crónica, y por lo tanto a la infertilidad. Esa infertilidad está relacionada con alteraciones en el ovario de los mecanismos de apoptosis/anti-apoptosis y con el estado inflamatorio. En este trabajo nos proponemos estudiar si el hiperandrogenismo altera el desarrollo folicular temprano en el ovario, evaluando la relación en la expresión génica de las proteínas antiapoptótica BCL2 y proapoptótica BAX, y de dos marcadores de inflamación temprana: interleuquina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral (TNFα). Para ello utilizamos ratas Spraque Dawley a la cuales le inyectamos vehículo (grupo control), gonadotrofina coriónica equina (25 UI/rata ip, grupo eCG) para inducir foliculogénesis, o eCG mas dehidroepiandrosterona (DHEA) para inducir foliculogénesis en presencia de hiperandrogenismo (25 UI/rata ip más 60 mg DHEA sc, grupo eCG+HA). 8 horas post-tratamiento sacrificamos los animales y extrajimos el RNA mensajero del tejido ovárico, a partir del cual evaluamos la expresión génica (Real Time PCR). La relación BAX/BCL2 disminuyó en el grupo eCG vs control (0.53±0.06 vs 1.00±0.11 UA), y en el grupo eCG+HA este retornó a niveles control (0.85±0.32 vs 0.53±0.06 UA). En cuanto a la inflamación, IL-6 disminuyó en el grupo eCG vs control (0.68±0.45 vs 3.36±1.57 UA), pero en el grupo eCG+HA retornó a niveles control (3.22±1.68 vs 3.36±1.57 UA), mientras que los niveles de TNFα aumentaron tanto en el grupo eCG y eCG+HA vs control (3.35±1.17 y 4.55±1.21 vs 1.58±1.40 UA) Concluimos que un exceso de andrógenos altera el desarrollo folicular temprano, por medio de un aumento en los mecanismos de apoptósis y de los marcadores de inflamación temprana.

ENDOCRINOLOGÍA 3

379 (290) CULTIVOS DE ESFEROIDES FORMADOS POR CÉLULAS DE LA PAPILA DÉRMICA PRESENTAN UNA MENOR EXPRESIÓN BASAL DE DICKKOPF 1 QUE CULTIVOS EN MONOCAPA Y SU SOBREEXPRESIÓN POR ANDRÓGENOS DESREGULA LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE DEL FOLÍCULO PILOSO

Gustavo Leiros; Julieta María Ceruti; Ana Gabriela Kusinsky; María Eugenia Balaña
ICT Milstein - CONICET

En el folículo piloso (HF) se encuentra la principal reserva de células madre multipotentes de la piel (HFSC). Estas intervienen en su regeneración cíclica, inducida por factores secretados por las células de la papila démica (DPC). En la alopecia androgenética (AGA), los andrógenos causan la miniaturización del HF a través de mecanismos no esclarecidos. Nuestros resultados previos indican que los andrógenos inhiben la vía de Wnt/-catenina, interfiriendo en la actividad secretora de las DPC, que impide la diferenciación de las HFSC. Dickkopf 1 (Dkk-1), antagonista de Wnt, se regula positivamente en respuesta a los andrógenos. Las DPC cultivadas en monocapa pierden la capacidad inductiva en pasajes sucesivos mientras que el cultivo en esferoides, agregados celulares 3D, conserva su inductividad.Se evaluó la regulación de la expresión del ARNm de Dkk-1 por dihidrotestosterona (DHT) en cultivos de esferoides y monocapa de DPC. Dkk-1 se indujo significativamente en ambos tipos de cultivo. Sin embargo, la expresión basal resultó significativamente menor en los esferoides respecto a la monocapa. Para determinar si Dkk-1 interfiere en la normal diferenciación de las HFSC, se evaluó la expresión de K6hf (queratina de linaje folicular) en HFSC cultivadas con sobrenadantes de cultivos de DPC. Los sobrenadantes provenientes de ambas modalidades de cultivo de DPC tratadas con Dkk-1 pierden su capacidad de inducir la diferenciación de HFSC, similar a lo observado con DHT. Los sobrenadantes de cultivo suplementados con Dkk-1, también pierden su capacidad inductiva.Concluimos que el incremento de expresión de Dkk-1 en respuesta a los andrógenos en DPC, actuaría de manera autocrina y/o paracrina sobre las HFSC, impidiendo la normal diferenciación de las HFSC y contribuiría al desarrollo de la AGA. La mayor expresión basal de Dkk-1 en cultivos de DPC en monocapa podría explicar en parte, la pérdida de inductividad de las DPC con los sucesivos pasajes en esta modalidad de cultivo.

380 (329) LA SOBRE-EXPRESIÓN DEL FACTOR SOX2 INDUCE UN CAMBIO MORFO-FUNCIONAL DE CÉLULAS TUMORALES HIPOFISARIAS GH3 HACIA UN FENOTIPO INDIFERENCIADO

Carolina Guido[1]; Alicia Vaca[1]; Liliana Sosa[1]; Fabiola Velazquez[2]; Pablo Perez[1]; Beatriz Caputto[2]; Silvina Gutierrez[1]; Jorge Mukdsi[1]; Alicia Torres[1]
INICSA[1] CIQUIBIC[2]

Resultados previos han permitido inferir que células hipofisarias que expresan marcadores de células stem (CS) y cancer stem cells (CSC) estarían involucradas en la etapas tempranas del desarrollo tumoral. Recientemente, en adenomas hipofisarios se ha descripto que la sobre-expresión del factor de transcripción Sox2, asociado a CS, estaría vinculada a la progresión tumoral. El objetivo de este trabajo fue seleccionar y caracterizar la población de células que crecen en suspensión como esferoides y expresan marcadores de CS y CSC a partir de cultivos primarios de tumores hipofisarios. Además, se propone analizar si la sobreexpresión de Sox2 modifica el comportamiento de la línea tumoral hipofisaria GH3.Se utilizaron cultivos de tumores hipofisarios de ratas hembras Fischer estrogenizadas por 30 días, con medios de selección para la obtención de pituesferas y de células GH3 transducidas con un vector retroviral que expresa Sox2 y GFP. Se realizó inmunofluorescencia para la detección de marcadores asociados a CS y CSC y análisis morfológico ultraestructural.Se determinó el metabolismo y la viabilidad celular en GH3 por ensayo de AlamarBlue.Las pituesferas obtenidas fueron positivas para GFRa2, Sox2, Oct4, Nestin, CD133 y CD44 y luego de la diferenciación con medio suplementado expresaron S100, vimentina y GFAP. La sobre-expresión de Sox2 en células GH3 indujo cambios ultraestructurales indicativos de indiferenciación celular incrementando además, el número de figuras mitóticas, la capacidad de formar esferoides, el metabolismo y la viabilidad celular con respecto a las GH3 control. Los resultados obtenidos demuestran que las pituesferas aisladas en cultivo poseen capacidad pluripotente y estarían involucradas en el desarrollo de adenomas hipofisarios. La formación de esferoides y las características morfológicas de células GH3 que sobre-expresan Sox2 evidencian un fenotipo más indiferenciado, sugiriendo un rol activo de este factor en la tumorogénesis hipofisaria

381 (339) ANÁLISIS DE LA ESPECIFICIDAD DE ANTICUERPOS COMERCIALES ANTI-RECEPTOR MAS

Valeria Burghi[1]; Iván Andrés Cervino[1]; Lucía Mazziotta[1]; Emiliana Echeverría[2]; Natalia Cristina Fernández[2]; Fernando Pablo Dominici[1]; Marina Cecilia Muñoz[1]
IQUIFIB, Depto. de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA[1] Cátedra de Química Medicinal, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA[2]

En los últimos años se ha incrementado el número de publicaciones que basan sus hallazgos en la utilización de anticuerpos cuya especificidad no ha sido validada. Esta observación es principalmente notoria en el caso de estudios de proteínas que se expresan en bajos niveles, como los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Nuestro grupo estudia el sistema renina angiotensina (SRA), particularmente el eje que involucra a la enzima convertidora de angiotensina de tipo 2, la angiotensina (1-7) y el receptor Mas (MasR). Dicho receptor pertenece a la familia de GPCRs, está constituído por 324 aminoácidos, con una masa molecular estimada de 37 kDa y es específico para la angiotensina-(1-7). El objetivo de este estudio fue determinar la especificidad de cuatro anticuerpos comerciales anti MasR, siguiendo una serie de criterios de especificidad establecidos para una adecuada validación de dichos anticuerpos. Para ello, utilizando anticuerpos comerciales dirigidos contra diferentes epitopes del MasR, se sometieron dos sistemas de expresión del MasR a las técnicas de Western Blotting (WB) e inmunocitofluorescencia (ICF). Mediante WB y RT-PCR, se investigó la presencia del MasR en corazón y riñón de ratones normales. El patrón de bandas detectado fue idéntico al obtenido por análisis de tejidos de ratones que no expresan el MasR (MasR-KO). A su vez, la intensidad de las bandas obtenidas mediante WB en solubilizados de células HEK293 en las que se sobreexpresó el myc-MasR no correlacionó con los diferentes niveles de expresión de dicho receptor. Finalmente, al analizar mediante ICF la presencia del MasR en estas células utilizando los anticuerpos anti MasR se observaron patrones de expresión diferentes a los que se obtuvieron con un anticuerpo anti-myc. Se concluye que los anticuerpos comerciales anti-MasR utilizados con mayor frecuencia no cumplen con los principales criterios de especificidad establecidos y su utilización puede conducir a conclusiones erróneas.

382 (349) ESTUDIO DE LA SECUENCIA DEL ARNM DE GNRH, DISTRIBUCIÓN TISULAR Y FISIOLOGÍA EN LA VIZCACHA DE LAS LLANURAS DE SUDAMÉRICA (LAGOSTOMUS MAXIMUS)

Santiago E Charif[1]; Pablo I F Inserra[1]; Alejandro R Schmidt[1]; Noelia P Di Giorgio[2]; Victoria Lux-Lantos[2]; Alfredo D Vitullo[1];Verónica B Dorfman[1]
Centro de Estudios Biomedicos, Ambientales y Diagnostico[1] IBYME[2]

La hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) es el factor clave en la regulación del eje reproductivo. GnRH y GAP (proteína asociada a GnRH) son codificadas por el factor preprogonadotrófico (preproG). La vizcacha (*Lagostomus maximus*) es un roedor con características reproductivas únicas como poliovulación natural de hasta 800 oocitos y ovulación durante la gestación. El objetivo de este trabajo fue identificar la secuencia del factor preproG y de la variante de GnRH que se expresa en el hipotálamo de la vizcacha, determinar su distribución tisular y el patrón de secreción. Se estudió el hipotálamo de vizcachas no preñadas para secuenciar el factor preproG hipotalámico mediante RACE-PCR, se cuantificó la expresión nucleotídica por PCR y proteica por RIA, y se determinó la pulsatilidad de GnRH en explantos hipotalámicos (n=6). Se identificaron dos variantes del transcripto del factor preproG. Éstas comparten la misma secuencia codificante pero difieren en 34 nucleótidos de la región 5'-UTR. Mediante su comparación con otros roedores se determinó una alta homología de secuencia con respecto a especies evolutivamente emparentadas como chinchilla, degú y cobayo (92, 88 y 87%, respectivamente), y menor homología con respecto a especies evolutivamente más lejanas como rata y ratón (81%). La región que codifica para GnRH resultó altamente conservada entre las especies y se correspondió a la variante mamífero. La expresión del ARNm y proteína de GnRH resultó significativamente mayor en hipotálamo con respecto a otras regiones cerebrales y tejidos reproductivos (ANOVA seguida del test de Newman-Keuls, $p<0,05$). Se determinó el patrón de liberación pulsátil de GnRH en un pulso por hora durante 6 horas. La presencia de la variante mamífero confirmaría su rol en la modulación del eje reproductivo. La existencia de dos variantes de transcriptos indicaría un equilibrio sensible entre la estabilidad del mensajero y su eficiencia traduccional (PIP-CONICET 0225/2011).

383 (372) PARTICIPACIÓN DE LA QUINASA DEPENDIENTE DE CICLINA 4 (CDK4) EN LA GENERACIÓN DE LOS DISTINTOS LINAJES ADIPOCITARIOS

Andrea Portales[1]; Isabel Lopez-Mejia[2]; Lluis Fajas[2]; Andres Giovambattista[1]
Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE-CIC-CONICET)[1] Department of Physiology, Université de Lausanne, Lausanne CH-1005, Switzerland[2]

Las proteínas implicadas en el control del ciclo celular también modulan el metabolismo, cumpliendo un rol integrador entre ambos procesos. Además, se sabe que desempeñan funciones en la diferenciación celular hacia distintos linajes, por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de CDK4 sobre los precursores adipocitarios del tejido adiposo (TA). Células de la fracción estroma vascular (FEV) del TA epididimal (TAE) e inguinal (TAI) de ratones macho adultos (C57BL/6) fueron aisladas y cultivadas hasta confluencia, momento en el cual se incubaron con o sin Palbociclib (inhibidor de la actividad de CDK4; grupo INH y CTR respectivamente) durante 48hs (d0). En experimentos adicionales se indujo la diferenciación adipocitaria post-tratamiento(d10) y, en otros, al d10 post-tratamiento y diferenciación se estimularon durante 4hs con Forskolina (Fsk). Se extrajo ARN total a los d0,

10 y 10post-Fsk de las células en las condiciones INH y CTR para la determinación de la expresión génica (qPCR). Los resultados mostraron que tanto en TAE como en TAI a d0 y d10 disminuyó la expresión de marcadores adipogénicos generales (PPARγ, AP2) y aumentó la de adipocitos beige (TBX1, TEMEM26, CD137) al inhibir la actividad de CDK4 (p<0,05). Adicionalmente, a d0 en TAI se registró un descenso de la expresión de CD34 y CD24 (marcadores de precursores blancos, p<0,05) en el grupo INH respecto al CTR, pero no así en TAE. Para los marcadores termogénicos (Ucp1, Dio2, Pgc1α) a d10 no se encontraron diferencias significativas entre los grupos CTR e INH en ninguno de los TA evaluados. No obstante, la estimulación con Fsk a d10 en el grupo INH indujo un aumento de Ucp1 y Dio2 en TAI (p<0,05 vs CTR+Fsk), no reproducible en TAE. Estos resultados indicarían que CDK4 controla, al menos parcialmente el tipo de precursor adipocitario generado en la determinación, favoreciendo el linaje blanco sobre el beige; y que este efecto sería dependiente del depósito de TA evaluado(PICT2013-0930).

384 (374) EFECTO BENÉFICO DE LA CASTRACIÓN PREPUBERAL SOBRE LA FUNCIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO

Ana Alzamendi[1]; Guillermina Zubiría[1]; Amanda Rey[1]; Andrea Portales[1]; Eduardo Spinedi[2]; Andrés Giovambattista[1]
IMBICE[1] CENEXA[2]

Los estudios de la relación entre la deprivación estrogénica pre-puberal, y el proceso adipogénico son controversiales. Nuestro objetivo fue evaluar la funcionalidad del tejido adiposo (TA) en la rata hembra adulta deficiente en estrógenos desde la pre-pubertad. Se utilizaron ratas hembra SD: grupo control (C), ovariectomizadas a los 27 días (OVX), y un grupo OVX-pair fed (OVXPF), dada la hiperfagia de los OVX respecto a los C. Determinamos diariamente (días 27 a 60 de vida) el peso corporal (PC) y la ingesta de alimento. A los 60 días se recolectó sangre troncal para determinaciones plasmáticas y se disecó, pesó y extrajo el RNA de TA retroperitoneal (TARP). De hembras C adicionales, se realizó el aislamiento de la fracción estroma vascular (FEV) de TARP; se realizaron cultivos en ausencia o presencia de Estradiol (E_2 0,01-1μM, 48 hs) en los que se determinó la expresión de marcadores pro- y anti-adipogénicos por qPCR. Los resultados indican que las OVX presentan un aumento en el PC y en la ingesta de alimento (p<0,05 vs. C), que se corrige en el grupo OVXPF. El cálculo de eficiencia calórica muestra un metabolismo diferencial entre las OVX, OVXPF y C. La castración indujo una disminución en la glucemia, no persistente en OVXPF. Las OVX PF presentaron menor masa (p<0,05) de TARP y TARP% vs. OVX y C. Las OVX PF tuvieron menores niveles de leptina plasmática y adipocitos de menor tamaño (p<0,05 vs. C). No se registraron cambios en la expresión de leptina y lipoproteinlipasa en TARP. Los cultivos de FEV muestran un efecto inhibitorio del E_2 sobre el potencial adipogénico, evidenciado por la menor expresión de PPARg-2, Zfp 423 y de CD34, un marcador de células con potencial adipogénico. En conclusión, los niveles bajos de estrógenos endógenos desde edad temprana inducen un efecto potencialmente benéfico sobre la función del TARP y de acuerdo a los resultados *in vitro* un aumento del potencial adipogénico de los precursores adipocitarios.(PIP 0198, PICT 2013-0930)

385 (381) FOSFORILACIONES DE LA COCHAPERONA DE HSP90, FK506-BINDING PROTEIN 51

Nadia Romina Zgajnar[1]; Cristina Daneri Becerra[1]; Mario Daniel Galigniana[12]
IBYME[1] Departamento de Química Biológica, FCEN-UBA[2]

La inmunofilina FKBP51 es una cochaperona de Hsp90 a la que recientemente hemos descripto en mitocondria, con acción antiapoptótica y sobreexpresada en células tumorales. Los Western blots muestran varias bandas que atribuimos a isoformas fosforiladas. Con el fin de evidenciar si estas isoformas tienen especificidad de organela, realizamos fraccionamientos subcelulares e incubamos a FKBP51 con fosfatasa alcalina en condiciones moderadas. En geles resolutivos, FKBP51 muestra al menos cuatro isoformas (a, b, c y d), estando las a y b ausentes en la fracción citosólica, y siendo las b y d abundantes en el núcleo. La isoforma d (la menos fosforilada) es escasa en las mitocondrias comparada con las fracciones nucleares, siendo la isoforma c abundante en ambas. Western blots con anticuerpos anti-fosfoaminoácidos mostraron señal para P-Thr. El fraccionamiento de extractos de hígado demostró que las formas mitocondriales de FKBP51 migran al núcleo durante el ayuno, lo que podría deberse al estrés generado por ayuno prolongado. Analizamos por microscopía confocal a FKBP51 en fibroblastos L1 ayunados de suero en un medio suplementado con variadas hormonas a fin de elucidar la contribución individual de cada sistema, lo cual a su vez se asocia al estado de fosforilación de FKBP51. La privación de suero relocaliza a FKBP51 en el núcleo, lo que se previene totalmente si el medio se suplementa con 1 mM cAMP, 1 mM cGMP, 4 μM insulina ó 0,2 ng/ml glucagón. Lo hace parcialmente con 0.3 nM angiotensina II ó 15 nM ADH (ambas activan la vía de ACTH in vivo), y no lo hace con 1 μM dexametasona, 50 nM ACTH, 3 nM epinefrina ó 75 μM forskolina. El factor común de las cascadas protectoras parece ser la producción de nucleótido cíclicos, la que se sabe es sinergística en el hígado para los casos de insulina y glucagón. Concluimos que FKBP51 es una fosfoproteína ubicua cuyo grado de fosforilación condiciona su localización subcelular, siendo ello regulado por el balance hormonal.

386 (463) MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS SELENOPROTEÍNAS POR EL ESTADO HIPOTIROIDEO

Alicia Juana Klecha[12]; María Laura Barreiro Arcos[2]; Eduardo Valli[2]; Luciana Cerchietti[3]; María Alejandra Paulazo[2]; María Celeste Díaz Flaqué[2]; Graciela Alicia Cremaschi[12]
Fac. de Farmacia y Bioquímica[1] BIOMED[2] CNEA CAC[3]

El selenio (Se) es un elemento traza esencial para la función de las selenoproteínas. Los objetivos de este trabajo fueron: 1-analizar la acción del hipotiroidismo experimental sobre los niveles de Se en plasma y en distintos tejidos incluidos los linfoides y 2-evaluar el efecto del contenido de Se tisular sobre la modulación de la actividad de selenoproteínas. Para ello, animales Balb/c fueron tratados con propiltiouracilo (PTU, 0.5 ug/ml) en el agua de bebida por 15 días (grupo hipotiroideo, hipo-) o con placebo (grupo eutiroideo, eu-). Los niveles hormonales en suero fueron cuantificados por radioinmunoensayo (eu- T3:115.0±12.5 ng/dl, T4:5.5±0.7 ug/dl, TSH: 47.8±5.4 ng/ml *vs* hipo- T3:60.6±10.2 ng/dl, T4:<1.0 ug/dl, TSH:64.2±6.8 ng/ml, p<0.05). Las concentraciones de Se en los tejidos pretratados de cada grupo experimental (n=5) fueron determinadas por espectrometría con rayos X por reflexión total. Se observó que el hipotiroidismo regula el contenido de Se en los tejidos estudiados, observándose para este estado tiroideo una reducción significativa de los niveles plasmáticos del mineral (hipo- 200 ± 16 ug/l vs eu- 414 ± 15 ug/l p<0.005). A su vez, se encontró una disminución de la actividad de la glutatión peroxidasa en los tejidos linfoides de los animales hipo- respecto de los eu- (% de inhibición 30.7±3.1; p<0.05). Este efecto fue acompañado por el aumento del estrés oxidativo, evidenciado por la reducción de los niveles de glutatión reducido (GSH) y por el incremento tanto de la peroxidación lipídica, como de las especies reactivas del oxígeno (ROS). Los resultados de este trabajo sugieren que el hipotiroidismo es capaz de modular el balance de Se en los tejidos, disminuyendo la actividad de las selenoproteínas lo que derivaría en un incremento del estrés oxidativo.

387 (495) CAMBIOS MORFOLÓGICOS Y SU CORRELACIÓN CON CAMBIOS HISTOLÓGICOS TIROIDEOS EN UN MODELO DE DISRUPCION ENDÓCRINA EN XENOPUS LAEVIS PROVOCADO POR DEL AGUA DE NAPA

María Fernanda Modarelli; Silvia Carbone; Yanina Alejandra Samaniego; Osvaldo J. Ponzo
Laboratorio de Endocrinología - Dpto. de Fisiología. Facultad de Medicina. UBA

La contaminación de aguas de napas puede vehiculizar sustancias con acción disruptora endocrina. Objetivos: Evaluar en

anfibios los cambios en la morfología, sensibles a la acción de hormonas tiroideas, en correlación con los cambios histológicos de la glándula tiroidea, en un modelo de disrupción provocada por aguas de napas contaminadas. Materiales y Métodos: Se utilizaron larvas de Xenopus Laevis inmersas en agua de: a) red de filtrada como control (C) (n=13), b) napa subterránea de 30 m. de profundidad de una ciudad del conurbano bonerense (ANS) (n=18) y c) conteniendo 0.007mg/l de perclorato de potasio como control positivo (CP) (n=18). Luego de 28 días de exposición se realizó la valoración morfológica (peso, talla y etapas de metamorfosis según los criterios Nieuwkoop y Faber) e histológica (grados de hiperplasia glandular, área coloidea y altura del epitelio folicular según las guías EPA: Environmental Protection Agency). Resultados: Duración de prometamorfosis: C: 21±2 dias, ANS: 32±2 días, CP: no completó ($p<0.001$). Peso y talla final mostraron diferencias en las etapas 60 y 62 de la metamorfosis. Peso: etapa 60 diferencias entre los tres grupos C > CP > ANS ($p<0.05$); etapa 62 CP > C > ANS ($p<0.01$). Talla: resultados similares al peso en etapa 60; etapa 62 CP > C = ANS ($p<0.01$). Mortalidad: solo presente en ANS (10%) ($p<0.0001$). Hiperplasia glandular tiroidea: etapa 60 ausencia en C, grado II en ANS y grado III en CP ($p<0.0001$); etapa 62 ausencia en C, grado III en ANS y en CP ($p<0.0001$). Area coloidea: etapa 60 sin cambios significativos; etapa 62 disminuyó en ANS y CP ($p<0.002$). Altura del epitelio folicular: etapa 60 fue diferente entre grupos en orden creciente C, ANS y CP ($p< 0.0001$); etapa 62 sin diferencias significativas en ANS. Conclusión: los cambios morfológicos e histológicos durante la metamorfosis en anfibios, que dependen fisiológicamente de las hormonas tiroideas, se ven afectados por la acción disruptora endocrina del agua analizada.

388 (505) ALTERACIONES HIPOFISARIAS DEL SISTEMA TGFβ1EN RATONES QUE SOBREEXPRESAN LA SUBUNIDAD β DE LA GONADOTROFINA CORIÓNICA HUMANA (β+HCG). DIFERENCIAS SEXUALES

Erika Faraoni; Laura Ratner; María Andrea Camilletti; María Cecilia Bottino; Alejandra Abeledo; Susana Rulli; Graciela Díaz-Torga
IBYME

Ha sido previamente descripto que ratones hembra que sobreexpresan la subunidad β de la gonadotrofina coriónica humana, desarrollan prolactinomas a lo largo de su vida, probablemente por el marcado incremento en los niveles de progesterona sérica. Sin embargo los machos del mismo genotipo no desarrollan estos tumores hipofisarios. TGFβ1 es una potente citoquina; se expresa en hipófisis, preferentemente en los lactotropos, al igual que sus receptores tipo 1 (ALK5) y tipo II (RTβII). TGFβ1 inhibe las funciones del lactotropo: proliferación celular y secreción de prolactina. En este trabajo nos propusimos evaluar las alteraciones hipofisarias sobre el sistema TGFβ1 en ratones adultos, tipo salvajes (wt) y β+hCG, de ambos sexos. A los 6 meses de edad las hembras β+hCG muestran un importante aumento en el peso hipofisario, acompañado de una concomitante hiperprolactinemia (PRL sérica medida por radioinmunoensayo) respecto a sus pares wt. Sin embargo, los machos de la misma edad no muestran diferencias entre genotipos en estos parámetros. Cuando evaluamos los niveles hipofisarios de TGFβ1 (por ELISA) observamos una disminución de la citoquina activa en las hipófisis β+hCG de ambos sexos, sin alteración en los niveles de citoquina total. Al evaluar la expresión del RTβII (por q- RT-PCR), la misma se encontró disminuída en hipófisis de hembras β+hCG. Por el contrario, las hipófisis de machos β+hCG presentaron niveles elevados del RTβII respecto a sus pares wt, que podría estar colaborando a conservar el efecto inhibitorio local de TGFβ1. Postulamos que las diferencias sexuales encontradas en las alteraciones que sufre el sistema TGFβ1 hipofisario de los ratones β+hCG podrían explicar, al menos en parte, el desarrollo de prolactinomas en hembras β+hCG, y no así en los machos.

389 (564) TESTOSTERONA FAVORECE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS PROSTÁTICAS REGULANDO LA EXPRESIÓN DEL EJE MYOCD/SRF

Carolina Leimgruber[1]; Nahuel Peinetti[1]; Luciana Noemí García[1]; María Victoria Scalerandi[1]; Joseph Miano[2]; Cristina Maldonado[1]; Amado Alfredo Quintar[1]
Centro de Microscopía Electrónica. INICSA-CONICET-Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.[1] Aab Cardiovascular Research Institute. University of Rochester.[2]

La diferenciación de las células musculares lisas depende de la expresión de genes cito-contráctiles que son regulados por sistema MYOCD/SRF. En próstata, la preservación del fenotipo muscular de las células musculares lisas prostáticas (CMLp) es clave en la homeostasis glandular tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Sin embargo, la presencia y regulación de MYOCD/SRF no ha sido estudiado en este órgano andrógeno-dependiente; por lo que nuestro objetivo fue evaluar la expresión de MYOCD/SRF, su regulación por Testosterona (T) y si la dediferenciación de CMLp inducida por inflamación implica cambios en este eje. Cultivos primarios de CMLp de rata se estimularon con T (10-5, 10-7, 10-12M) o su vehículo (ctrol) por 24h y se procesaron para analizar la expresión de MYOCD/SRF, marcadores de fenotipo muscular (ACTA2, CNN) y el marcador de fibroblasto (VIM) por qPCR y WB. Análisis estadístico ANOVA-Tukey. Testosterona incrementó el mRNA de MYOCD y SRF así como también de ACTA2 y CNN en forma dosis dependiente, indicando que T induce diferenciación de CMLp. Por otro lado, se usó LPS como inductor de dediferenciación; las CMLp se estimularon con LPS 1ug/ml por 48hs y luego se agregó T (10-7 ó10-12M) al medio por 48 hs adicionales. LPS indujo disminución de Myocd ($p<0,05$) y SRF ($p<0,05$), y descenso en los niveles de mRNA y proteína de ACTA2 y CNN. En contraste, luego del tratamiento con T, la expresión MYOCD y SRF alcanzó niveles similares al control con la dosis T10-12 e incluso superiores con T10-7. Este efecto de T se acompañó con el restablecimiento de la expresión de ACTA2 y CNN y disminución de VIM. En el mismo sentido, T disminuyó la proliferación de CMLp inducida por LPS (determinada por inmunomarcación de Ki67). Estos resultados evidencian que los andrógenos inducen diferenciación de CMLp regulando la expresión de eje miodiferenciacdor MYOCD/SRF, contribuyendo de esta forma a preservar y/o recuperar el fenotipo muscular normal en la próstata.

390 (577) EFECTOS TEMPRANOS DEL OLIGODEOXINUCLEÓTIDO IMT504 SOBRE LOS ISLOTES DE LANGERHANS EN UN MODELO DE DIABETES TIPO I EN RATONES

S Bianchi[1], A Montaner[2], NA Chasseing[1], M Massimino[1], DA Perez[1], C Libertun[1, 3], VA Lux-Lantos[1] y MS Bianchi[1]
IBYME-CONICET[1], ICT Milstein-CONICET[2]y Facultad de Medicina, UBA[3], Buenos Aires, Argentina.

Previamente demostramos que el oligonucleótido inmunomodulador IMT504 induce una marcada recuperación de la diabetes tóxica inducida por estreptozotocina (STZ) en ratas (Diabetologia 2010,53:1184), sin alterar parámetros inmunes (DiabetesMetabResRev 2012;28:156). El IMT504 también mejora la condición diabética en un modelo de diabetes autoinmune inducido por múltiples dosis bajas de STZ en ratones (MLDZ), observándose efectos beneficiosos tempranamente (2 a 5 dosis del IMT504). Acá, evaluamos el efecto del IMT504 sobre la expresión génica en islotes frescos obtenidos de ratones diabéticos y controles. Ratones macho Balb/C fueron inyectados 5 días consecutivos con STZ (40mg/kg, ip) o con diluyente (C). Ratones STZ con glucemias >250 mg/dl y C fueron inyectados diariamente con IMT504 (20mg/kg/dosis, sc) (STZ-IMT, C-IMT) o salina (STZ, C) y sacrificados luego de dos disminuciones consecutivas en la glucemia de los STZ-IMT (2-5 dosis). Se extrajo ARN de islotes pancreáticos aislados de los diferentes grupos y se midió la expresión génica por PCR en tiempo real. IMT504 normalizó la glucemia rápidamente [glucemia (mg/dl): C=125±4, C-IMT: 104±4, STZ: 355±21*, STZ-IMT: 155±10, * diferente a todos: $p<0.001$] e indujo cambios en la expresión relativa de preproinsulina 2 [*Ins2*/ciclofilina (*Ppib*): C=0.98±0.15, C-IMT: 0.89±0.15, STZ: 1.80±0.31*,

STZ-IMT: 0.73±0.14, * diferente a todos: p<0.05], proglucagon [*Gcg/Ppib*: C=1.05±0.30, C-IMT: 1.41±0.31, STZ: 4.00±0.68*, STZ-IMT: 2.32±0.27, * diferente a los controles: p<0.002] y nestina [*Nes/Ppib*: C=1.05±0.25, C-IMT: 0.73±0.18, STZ: 2.32±0.35*, STZ-IMT: 1.13±0.28, * diferente a todos: p<0.03], sin cambios en preproinsulina 1 ni *Pdx1*. Estos resultados sugieren que la rápida normalización de la glucemia promovida por el IMT504 se acompaña de cambios en la expresión génica en los islotes de los animales diabéticos. (CONICET, UBA, ANCYPT, Fundación René Barón, Johnson&Johnson-Argentina).

391 (601) CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE DOS PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGÉNITA Y FENOTIPO ASOCIADO AL SÍNDROME DE GENES CONTIGUOS EHLERS DANLOS

Marino, Roxana[1]; Perez Garrido, Natalia[1]; Ramirez, Pablo[1]; Finkielstain, Gabriela[2]; Alonso, Guillermo[3]; Romina, Armando[3]; Bergadá, Ignacio[2]; Obregón, Gabriela[1]; Rivarola, Marco A[1]; Belgorosky, Alicia[1]
Hospital de Pediatría Juan P Garrahan SAMIC[1] División Endocrinología Hospital de Niños Gutierrez[2] Hospital Italiano de Buenos Aires[3]

Introducción: El sindrome de deleción de genes contiguos, Síndrome de Ehlers Danlos (ED), fue descripto en un 7% de los pacientes con hiperplasia suprarrenal congénita (HSC) con una quimera *TNXA/TNXB* que resulta en deleciones del gen *CYP21A2* que codifica para la enzima 21-hidroxilasa, necesaria para la biosíntesis de cortisol, y del gen *TNXB* que codifica para una glicoproteína de la matriz extracelular tenascina-X (TNX). Existen dos quimeras *TNXA/TNXB* descriptas, como asi también mutaciones puntuales en *TNXB* que resultan en haploinsuficiencia de este gen, disrupción de la señalización del TGF-β y fenotipo Síndrome ED. También existe una forma autosómica recesiva de este Síndrome.Objetivo: Caracterización molecular de dos pacientes no relacionados con diagnóstico de HSC y fenotipo asociado al Síndrome de genes contiguos ED.Métodos: Se analizaron las 10 mutaciones puntuales más frecuentes descriptas en el gen*CYP21A2* mediante PCR alelo específica, RFLP y la presencia de grandes rearreglos en el locus (*CYP21A2*; *TNXB*) mediante Southern blot y Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA).Resultados: En ambos pacientes se pudo determinar la alteración molecular del gen *CYP21A2* como así también haploinsuficiencia del gen *TNXB* responsables del Sindrome Ehlers Danlos. En ambos casos se detectó la presencia de una quimera *NXA/TNXB,* caracterizada por una deleción de 120 pb en el exón 35 de *TNXB* y deleción del gen *CYP21A2* en un alelo, y una alteración en el gen *CYP21A2* en el otro (-8pb en P1 y macroconversión en P2)Conclusión: El Síndrome ED se puede encontrar en pacientes con HSC debido a la deficiencia de 21-hidroxilasa. Se debería realizar una evaluación clínica de la displasia del tejido conectivo en pacientes con HSC especialmente en aquellos pacientes portadores de una deleción.

392 (62) EL AGREGADO DE ANTIOXIDANTES EN EL MEDIO DE INCUBACION PREVIENE EL AUMENTO DE LA REACTIVIDAD TRAQUEAL "IN VITRO" QUE SE OBSERVA LUEGO DE LA ADMINISTRACION CRONICA DE FRUCTOSA

Carlos F Reyes Toso; Marina L Wallinger; Javier Torres-Batán; María L Reyes Toso; Laura M Linares
Universidad de Buenos Aires; Facultad de Medicina; Depto de Fisiología y Biofísica UA II

La administración crónica de fructosa al 10% -F10%- en la bebida induce la producción de un cuadro que se caracteriza por presentar insulino-resistencia y dislipidemia que se asemeja al Síndrome Metabólico (SM). Dentro de los mecanismos fisiopatológicos involucrados en el SM se considera que el estrés oxidativo podría jugar un papel importante. Por otro lado en presentaciones anteriores, se ha descripto la reducción de la respuesta vasodilatadora endotelio-dependiente en anillos aórticos y pulmonares incubados "in vitro". Este efecto estaría vinculado a una menor formación o mayor metabolización del óxido nítrico –ON- en las paredes arteriales. En este trabajo se ha evaluado el efecto de la administración de F10% (20 semanas) sobre la reactividad traqueal "in vitro" y el efecto de la pre-incubación con sustancias antioxidantes. Ratas Wistar (machos) se dividieron en dos grupos (n=8 c/u): a) dieta estándar -DE-, b) DE + F10%. Se evaluaron: la presión arterial sistólica (PAS), sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico -TBARS-, nitritos -Ni- y diversas variables metabólicas. A las 20 semanas se sacrificaron, se extrajo la tráquea, se seccionó en anillos y luego se dividió en segmentos de 3 a 4 mm de longitud. Los mismos se montaron en un dispositivo de registro de tensión isométrica conectado a una computadora, y se colocaron en un baño para tejidos con solución de Krebs estándar. Luego de un período de aproximadamente 1 hora se efectuaron curvas dosis respuesta a la acetilcolina (Ach) en presencia o ausencia de N-Nitro-L-Arginina (NNLA), superóxido dismutasa (SOD) y Tirón. Resultados: La F10% -ANOVA- incrementó la PAS, los Ni y TBARS (P<0.001). La respuesta contráctil a la Ach en este grupo fue mayor (P<0.01). La pre-incubación con SOD o Tirón evitó dicho efecto (P>0.05), mientras que con NNLA la aumentó (P<0.01). El mecanismo de acción dependería de la mayor producción de peroxinitritos, de marcado efecto constrictor, formados a partir del Oxido Nítrico.

FARMACOLOGÍA 3

393 (261) EL GLICEROL FOSFATO (GLI-P) ACTÚA COMO MEDIADOR DE APOPTOSIS VÍA ESTRÉS OXIDATIVO (EO) Y PROTEÍNAS QUINASAS EN LESIONES FOCALES HEPÁTICAS (LFH)

Alejo M Capiglioni; Florencia Lorenzetti; Juan Pablo Parody; Ariel D Quiroga; Flavia Lambertucci; María Cristina Carrillo; María Paula Ceballos; María De Lujan Alvarez
IFISE

Nuestro grupo observó que la administración oral de GLI a ratas con LFH proliferantes, reduce el tamaño de las lesiones. El GLI-P se produce por acción de la GLI quinasa sobre el GLI liberado de los triglicéridos. Se ha demostrado que el GLI-P actúa como mediador en la generación de EO mitocondrial, que participaría en diversas vías de señalización. Objetivo: analizar los mecanismos por los cuales el GLI afecta el crecimiento de las LFH. Métodos y resultados: ratas Wistar macho adultas fueron sometidas a un modelo químico de iniciación-promoción (IP) para la obtención de LFH. Otro grupo IP recibió además GLI (10%v/v, IPGLI). Los niveles intrahepáticos de GLI-P (cuantificación enzimática) se mostraron aumentados en las ratas tratadas con GLI (IP:100±8%; IPGLI:137±5%*), al igual que los niveles de EO (determinados indirectamente por peroxidación lipídica, IP:100±9%; IPGLI:157±7%*). Los niveles de glutatión oxidado/total no mostraron diferencias entre grupos. En el grupo IPGLI la actividad catalasa se mostró disminuida (IP:108±7%; IPGLI:72±1%*) y la actividad superóxido dismutasa aumentada (IP:100±7%; IPGLI:146±5%*). El análisis de proteínas quinasas mostró aumento de p-JNK/JNK total (JNK1: IP:100±23%; IPGLI:363±81%*; JNK2: IP:100±21%; IPGLI:526±51%*) y disminución de p-ERK2/ERK2 total (IP:100±13%; IPGLI:43±12% *) en el grupo IPGLI, sin cambios en p-ERK1/ERK1 total. Además, el grupo IPGLI mostró un aumento de la apoptosis (actividad caspasa-3: IP:100±18%; IPGLI:135±4%*; índice mitocondrial Bax/Bcl-2: IP:1,0±0,4; IPGLI:2,9±0,5*) (*p<0,05). Conclusión: la administración de GLI a ratas con LFH proliferantes reduce el tamaño de las mismas por aumento de la producción de GLI-P, el cual conduce a la generación de EO, con modificaciones de las defensas antioxidantes y de quinasas clave en el balance proliferación/muerte celular. Este mecanismo favorece el aumento de apoptosis, que deriva en la reducción de las LFH.

394 (363) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GPAT2 Y RESISTENCIA AL ATRA EN MODELOS CELULARES DE CÁNCER HUMANO

Elizabeth Cattáneo; Mauro A Montanaro; María B García Fabiani; María R Gonzalez Baró
INIBIOLP

Clásicamente se han descripto a las glicerol-3-fosfato aciltransferasas como enzimas sintetizadoras de glicerolípidos. Sin embargo, la isoforma GPAT2 se diferencia de las demás GPATs en cuanto al tejido en el que se expresa (principalmente testículo) y a su regulación transcripcional. Previamente demostramos que la expresión de GPAT2 se correlaciona con la capacidad tumorigénica *in vivo* y el fenotipo tumoral de ciertas líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231) y colon (HCT-116). Los retinoides son un grupo de compuestos derivados de la vitamina A entre los que se encuentran los metabolitos activos ácido 9-cis retinoico y ácido retinoico todo trans (ATRA). Estos compuestos regulan el crecimiento y la diferenciación celular y son utilizados como agentes quimioterapéuticos para inhibir la metástasis. Nuestro grupo demostró que estos compuestos incrementan la actividad transcripcional del promotor de Gpat2 de ratón *in vitro*. Tanto las células HCT-116 como las MDA-MB-231 se clasifican como resistentes al tratamiento con ATRA. Teniendo en cuenta que la expresión de GPAT2 humana incrementa la proliferación y migración en estos modelos celulares, decidimos estudiar si su expresión se encuentra también estimulada por retinoides contribuyendo así al mecanismo de resistencia. Nuestros resultados nos permitieron demostrar que tanto el nivel del ARNm como el de la proteína GPAT2 aumentan en respuesta al ATRA, alcanzando sus valores máximos de expresión a las 6 y 24 hs de tratamiento respectivamente. Mediante experimentos de silenciamiento también hallamos que el ATRA atenúa de manera más potente las características tumorales de las células en ausencia de expresión de GPAT2. Estos resultados nos permiten proponer a la expresión elevada de GPAT2 como la causa, al menos parcial, de la conocida resistencia al tratamiento con ATRA de algunas líneas celulares derivadas de cáncer humano.

395 (396) EFICACIA DE UN MODELO PROACTIVO DE FARMACOVIGILANCIA HOSPITALARIA

Guillermo A Keller; Roberto A Diez;Guillermo Di Girolamo
Segunda Cátedra de farmacologia - Facultad de medicina - UBA

En Argentina, la Red Nacional de Farmacovigilancia está centrada en ANMAT, y nodos periféricos. Nuestro nodo, utilizó un esquema proactivo para incentivar la recolección de notificaciones, además del registro de notificaciones espontáneas. El objetivo del trabajo es evaluar la eficacia de del enfoque proactivo para combatir la subnotificación. Todas las notificaciones fueron incorporadas a una base de datos (SQL), y se enviaron a ANMAT. Describimos aquí las notificaciones recibidas, la proporción obtenida según el enfoque utilizado y el resultado de la intervención analítica del INAME, cuando la misma fue requerida. De 2004 a 2015 se recibieron 4250 notificaciones (95% reacciones adversas, 4% falta de eficacia y 1% falla de calidad). La mayoría (98%) fueron obtenidas por el enfoque proactivo, notándose un incremento paulatino de la frecuencia de obtención en función del tiempo, mientras que las notificaciones esponáneas se mantuvieron estables a ritmos inferiores a las 10/año. Las reacciones adversas fueron causadas predominantemente por fármacos antimicrobianos, cardiovasculares y neurológicos. De ellas 21% fueron serios mientras que la repercusión clínica fue clasificada como 72% leves, 8% moderados y 20% severas. Los problemas de eficacia/calidad estuvieron relacionados predominantemente a fármacos cardiovasculares, neurológicos, y antimicrobianos. Las notificaciones recibidas generaron conductas como cambio de fármaco, marca comercial, o dosis, realización de estudios complementarios, internación, u tratamiento específico de un evento generado. Las muestras de notificaciones de problemas de calidad/eficacia fueron analizadas por INAME con resultado de “cumple con las especificaciones”. Los datos nos permiten concluir que el enfoque proactivo presenta incrementos en las notificaciones obtenidas en forma sostenida con escaso costo, constituyendo una medida efectiva para combatir el problema de subnotificación en centros de farmacovigilancia.

396 (398) EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA MEPERIDINA SOBRE EL INTERVALO QTC EN LA PRÁCTICA CLÍNICA COTIDIANA

Guillermo A Keller[1]; Andrea Schimpl[1]; María Cecilia Villa Villa[1]; Nicolás Fernández[3]; Nancy M Olivera[3]; Patricia N. Quiroga[3]; Roberto A Diez[1];Guillermo Di Girolamo[1]
Segunda Cátedra de Farmacologia - Facultad de Medicina - UBA[1] CENATOXA - Cátedra de Toxicología y Química Legal - Facultad de Farmacia y Bioquímica – UBA.[3]

El síndrome de QT largo es un efecto adverso serio que motivó el retiro de muchos fármacos, y se encuentra vinculado a varios opioides como dextropropoxifeno, fentanilo, y metadona. Se realizó ECG y laboratorio, basal y durante el tratamiento a pacientes que recibieran Meperidina como analgésico y se cuantificó el fármaco en plasma espectrometría de Masas (GC - MS). Se incluyeron 58 pacientes (45% hombres), con edad promedio±DS (Rango) de 73±11 (50-89) años, peso 74±11 (60-99) Kg e indice de masa corporal 26,44±4,68 (18,31-35,50) Kg/m2.Entre los antecedentes, 26 (44,8%) pacientes presentaron por lo menos un factor de riesgo para QT prolongado: arritmia (8,6%), insuf Cardíaca (6,9%), insuficiencia hepática (8,6%), insuf renal (6,9%), hipotiroidismo (5,2%), enf del SNC (6,9%), diabetes (16%), y obesidad (26%). A nivel basal, los pacientes tenían [parámetro: promedio ± desviación estándar (rango)]: intervalo R-R’ (mseg) 826±97 (600-980), QT (mseg) 328±40 (240-380), QTcB (mseg) 360±33 (259-424). Intratratamiento, recibiendo meperidina a una dosis de 304±133 (120-480) mg/día y presentaron R-R’ (mseg) 756±109 (580-960), QT (mseg) 322±45 (240-420), QTcB (mseg) 370±30 (305-433). El ΔQTc fue +9 ±42 (-90 a +96) mseg. El 26% presentó ΔQTc>30 mseg y el 14% fue >60 mseg. Las concentraciones de meperidina y normeperidina fueron: 369±60 (265-519) y 49±17 (15-78). El QTc mostró correlación con las concentraciones plasmáticas de fármaco y metabolito (R=0,37 y 0,55 respectivamente) y el ΔQTc se correlacionó aún mejor (R=0,69 respecto a meperidina y R=0,82 respecto de normeperidina). Se corrobora un claro efecto concentración-dependiente sobre el intervalo QTc. No se evidenciaron casos de prolongación dle intervalo QTc en valor absoluto (QTc> 470) ni casos de arritmias cardíacas asociadas. La meperidina parece tener un efecto de prolongación del intervalo QT cuando se mide por ΔQTc sin gran repercución clínica.

397 (551) MODULACIÓN DE TRANSPORTADORES ABC POR LA PROGESTINA NOMEGESTROL ACETATO (NMGA) EN LA LÍNEA CELULAR HEPÁTICA HUMANA HEPG2

Guillermo Nicolás Tocchetti; Juan Pablo Rigalli; María Laura Ruiz; Silvina Stella Maris Villanueva; Aldo Domingo Mottino
IFISE

El hígado desempeña un papel fundamental en la depuración de xenobióticos. Los transportadores canaliculares de la familia ABC (ATP Binding Cassette) P-gp (P-glicoproteína, ABCB1), MRP2 (proteína asociada a resistencia a multidrogas 2, ABCC2) y BCRP (proteína de resistencia del cáncer de mama, ABCG2) y el transportador basolateral MRP3 (proteína asociada a resistencia a multidrogas 3, ABCC3) cumplen un rol clave en la excreción de fármacos a la bilis y a los sinusoides, respectivamente. Alteraciones en la expresión y/o actividad de los mismos son una causa frecuente de interacciones droga-droga que pueden alterar la eficacia y/o la seguridad de un tratamiento. NMGA es una progestina de empleo creciente como anticonceptivo oral. Su uso en tratamientos prolongados aumenta las posibilidades de administración simultánea con otras drogas. Hasta el presente se desconoce si ejerce algún efecto modulador sobre la expresión de transportadores ABC de relevancia farmacológica y, por ende, sobre la excreción de drogas coadministradas. En el presente trabajo se trataron células HepG2 con NMGA (0,5, 5, 50 y 500 nM, 48 h) o vehículo y se evaluó la expresión proteica de P-gp, MRP2, BCRP y MRP3 por inmunoblot. P-gp mostró una inducción significativa a las concentraciones 5, 50 y 500 nM (+83, +77 y +93%, respectivamente; $p<0,05$, $n=3$). MRP2 por su

parte mostró una inducción significativa luego del tratamiento con NMGA únicamente a la dosis 5 nM (+159%; p<0,05, n=3). No se observaron cambios significativos en la expresión de BCRP ni MRP3 a ninguna de las concentraciones ensayadas. Los resultados observados demuestran una regulación diferencial de los transportadores estudiados. El aumento de la expresión de P-gp y MRP2 sugeriría alteraciones en la farmacocinética de drogas sustratos de estos transportadores que sean coadministradas con NMGA.

398 (557) ACTIVIDAD DEL METIL GALATO SOBRE EL TRACTO GASTROINTESTINAL

María Laura Anzoise; Julieta Sofía Del Mauro; Andrea Carranza; Susana Gorzalczany
Cátedra de Farmacología-FFyB-UBA

La enfermedad inflamatoria intestinal es un trastorno gastrointestinal crónico e idiopático caracterizado por lesiones de la mucosa, diarrea y dolor abdominal. Actualmente, no existe un tratamiento que permita obtener una respuesta totalmente satisfactoria para los pacientes. Los extractos de plantas medicinales o compuestos aislados de las mismas pueden ofrecer alternativas terapéuticas para el tratamiento de esta enfermedad. El objetivo de este trabajo fue estudiar la actividad del metil galato (MG) sobre el tracto gastrointestinal utilizando un modelo de colitis inducida por acido acético en ratas, un modelo de diarrea y otro de motilidad intestinal inducidos por aceite de ricino en ratones. También se evaluó el efecto espasmolítico del compuesto en yeyuno aislado de rata. El metil galato (300 mg/kg, vo) redujo significativamente el peso del colon (colitis+: 545.2±36.2 mg; MG 300 mg/kg, vo: 374.0±34.7mg; MG 100 mg/kg, vo: 528.5±66.98 mg; mesalazina 100 mg/kg, vo: 329±36.91 mg), el score del daño (colitis+: 3.4±0.2; MG 300 mg/kg, vo: 2.25±0.5; MG 100 mg/kg, vo: 2.5±0.65; mesalazina: 1.8±0.20) y los niveles de TBARs (colitis+: 5.27±0.9; MG 300 mg/kg, vo: 1.41±0.2; mesalazina: 4.267±0.54). Además, la dosis más alta de MG produjo una recuperación parcial de los daños histológicos inducidos por el acético y una disminución de la expresión aumentada de COX_2 en el modelo experimental de colitis. El MG (100 y 300 mg/kg, vo) prolongó significativamente el tiempo transcurrido hasta la aparición de diarrea y redujo la motilidad intestinal. El compuesto también disminuyó de manera concentración-dependiente, el efecto máximo de las curvas acumulativas inducidas por acetilcolina (Emáx 1 mg/ml: 91.97%) y el mismo resultado se obtuvo para la curva de $CaCl_2$ (Emáx 1 mg/ml: 100%), en yeyuno aislado de rata. En conclusión, el metil galato, mostró un efecto antiinflamatorio, antidiarreico y antiespasmódico y antioxidante en los modelos experimentales empleados.

399 (612) SECRECIÓN DE NANOVESÍCULAS CON ACTIVIDAD ATPÁSICA POR ESTIMULACIÓN HISTAMINÉRGICA EN LA GLÁNDULA SUBMANDIBULAR DE RATA

Betina Orman[1]; Noelia Balcarcel[2]; Emmanuel Quinteros Villarruel[1]; Matias Barbieri Van Haaster[2]; Macarena Brandt[2]; Debora Gonzalez[2]
Cátedra de Farmacologia FOUBA[1] Cátedra de Biofisica FOUBA[2]

La glándula submandibular (GSM) secreta a la saliva proteínas como mucina y amilasa. La histamina (His) modula esa secreción. La GSM también libera pequeñas vesículas extracelulares que poseen la capacidad de hidrolizar ATP y ADP. Objetivo: caracterizar el efecto de la His sobre la producción de nanovesículas y su actividad ATPásica en la GSM de rataMétodos: fragmentos de GSM de ratas Wistar macho de 80 días se incubaron durante 30' a 37ºC en solución fisiológica (pH 7,4), sin o con His y antagonistas de los receptores H_1 y H_4, pyrilamina y *JNJ* 10191584, respectivamente. Los medios de incubación fueron centrifugados sucesivamente 15' a 2000 g y 60' a 27000 g. Los pellets obtenidos fueron analizados por microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa, se midieron proteínas con el método de Bradford y la actividad ATPásica dosando el fosfato (P_i) liberado a partir de 3 mM MgATP con el método colorimétrico de Baginski.Resultados:A partir de las GSM se obtuvieron pellets conteniendo vesículas con diámetro <150 nm, en las que se midió la actividad ATPásica.El 80% de la actividad ATPásica decayó con $T_{1/2}$ @ 2 min, lo que es característico de la NTPDasa2.La actividad ATPásica de las vesículas se incrementó cuando las GSM se incubaron en presencia de His (10^{-10} hasta 10^{-5} M), obteniéndose un pico máximo a 10^{-8} M (Pi: His 10^{-8} M vs basal ± ES= 1,73 ± 0,24 vs 0,72 ± 0,08 nmoles Pi /min/mg peso húmedo, n=6 por duplicado).La actividad ATPásica se redujo cuando las GSM fueron incubadas en presencia de His + *JNJ* 10191584, pero no en presencia de pyrilamina. Conclusiones: la His estimula la secreción de nanovesículas con actividad ATPásica en la GSM de la rata, en forma concentración dependiente, a través de la activación del subtipo H_4. Estas vesículas podrían ser el vehículo para transportar nucleotidasas que regulen las concentraciones de ATP, ADP y adenosina y las respuestas purinérgicas en los ductos glandulares.Financiado por UBACYT 200201202200253BA

400 (631) BUSQUEDA DE MARCADORES MOLECULARES EN SALIVA TOTAL EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDEA Y ENFERMEDAD PERIODONTAL. ESTUDIO PRELIMINAR

Teresita Ferrary[1]; Bianchi Liz[1]; Armada Maríana[1]; Echaide Maríana[1]; Quinteros Villarruel Emmanuel[2]; Orman Betina[1]
Cátedra de Patologia y Clinica Buco Dental[1] Cátedra de Farmacologia FOUBA[2]

La saliva es un importante determinante de la salud bucal y juega un rol central en la regulación de la ecología oral. Es una fuente potencial de nuevos marcadores diagnósticos y de objetivos terapéuticos, debido a que su recolección es simple y mínimamente invasiva. El objetivo de este estudio preliminar fue investigar la posible presencia de marcadores moleculares diferenciales para la detección de artritis reumatoidea con diferentes terapéuticas y enfermedad periodontal. Materiales y Métodos: 10 muestras de saliva total de pacientes en estado de salud, 10 con artritis reumatoidea (AR) y enfermedad periodontal (EP), 10 muestras con AR y EP tratados con metrotexato (MTX) y 7 con AR y EP tratados con biológicos. Las muestras fueron extraídas en estado de reposo. Se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry. La técnica analítica empleada fue electroforesis bidimensional, con tinción con Coomassie brilliant blue Resultados: Se observaron geles bidimensionales de muestras de saliva total adultos en estado de salud y de pacientes con AR y EP, medicados con MTX y con biológicos. Esta técnica confirmó la complejidad de las muestras y permitió visualizar un alto grado de polimorfismo, particularmente en las amilasas y en la región en que se ubican las proteínas ricas en prolina e histatina. Se han observado diferencias y similitudes entre las muestras. Se han desarrollado mapas que llevan al reconocimiento de que aunque hay solamente unos pocos genes codificantes hay una tremenda diversidad de péptidos y proteínas como consecuencia de procesos de modificaciones post-traduccionales. Se están realizando estudios para confirmar las proteínas diferenciales, las cuales podrían ser una herramienta útil para el mejor conocimiento del AR y su relación con la EP.

401 (661) ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE EXTRACTOS POLIFENÓLICOS DE PAPAS ANDINAS EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B

María Martinez[1]; Adriana B. Andreu[1]; L Barbini[2]
Instituto de Investigaciones Biologicas[1] Cátedra de Microbiología Clínica, Universidad Nacional de Mar del Plata[2]

Las infecciones por el virus de la hepatitis B (HBV) son un problema de salud con 400 millones de infectados en el mundo. A pesar de la existencia de drogas antiHBV, como el INFα o los análogos de nucleósidos, pueden aparecer efectos adversos y surgir mutantes resistentes. Existe la necesidad de nuevas drogas con actividad antiHBV y los compuestos polifenólicos naturales serían potenciales nuevas moléculas. El objetivo es estudiar la actividad antiHBV *in vitro* de extractos polifenólicos

de papas andinas (EPP, variedad CL658). La actividad anti-HBV se ensayó en la línea celular HepG2 2.2.15. Se trataron con diferentes concentraciones de EPP (25, 50, 75, 100, 150 y 200 µg/mL) por 6 días. Se determinó la máxima concentración no citotóxica (MCNC) midiendo viabilidad y muerte mediante: ensayo de MTS, tinción con azul tripán (AT) y tinción con bromuro de etidio/naranja de acridina (BE/NA). Se estudiaron cambios morfológicos característicos por microscopía de contraste de fases y electrónica. Como medida de replicación viral se cuantificó el HBsAg en los sobrenadantes de células controles y tratadas con 25 y 50 µg/mL de EPP, por un enzimoinmunoensayo. El EPP resultó citotóxico de manera dosis y tiempo dependiente, resultando la MCNC 50 µg/mL. La tinción con BE/NA mostró un aumento en el número de células apoptóticas en concentraciones mayores a 50 µg/mL al sexto día de tratamiento. No se observaron alteraciones morfológicas en las células tratadas con 50 µg/mL a diferentes tiempos. El tratamiento con EPP redujo la concentración del HBsAg en los sobrenadantes de manera dosis y tiempo dependiente, con respecto a los controles. La inhibición de la replicación viral en presencia de EPP se evalúa actualmente determinando HBeAg y la cuantificando el DNA viral por RT-PCR. Se determinará el mecanismo de acción antiviral del EPP. En base a los resultados obtenidos, el EPP posee actividad antiHBV y sería una fuente potencial de nuevos antivirales para el tratamiento del HBV.

402 (663) INHIBICIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS ERITROIDES UT-7 Y CÉLULAS TUMORALES MAMaríaS MCF-7 POR DOS FORMULACIONES DE EPOETINA ALFA IN VITRO

M. Gabriela Lombardi[1]; Paola Martnez Pulido[1]; Ganna Dmytrenko[1];Roberto A. Diez[2]; Mara Elena Sales[1]
CEFYBO[1] Biosidus S.A.[2]

La eritropoyetina, una glicoproteína que regula la eritropoyesis, es producida como proteína recombinante (epoetina, EPO), activa el receptor de eritropoyetina (EPOR, expresado también en células no eritroides) y se emplea en diversas formas de anemia. Evaluamos el efecto de dos formulaciones de epoetina alfa (Eprex®, Janssen-Cilag y Hemax®, Biosidus) en una línea eritroide humana (UT-7, eritropoyetina-dependiente) y una línea tumoral maMaría (MCF-7), midiendo su proliferación, apoptosis y señalización del EPOR (fosforilación de STAT5) entre 1 y 10 U/ml. Los datos (promedio ± SEM consolidados de ambas formulaciones cuando no difirieron) fueron comparados con ANOVA y prueba de Tukey. Con MTT, EPO (96 h) estimuló la proliferación de UT-7 entre 5 y 10 U/ml (3,0±0,2 y 2,3±0,1 veces de aumento vs el control, p<0,0001). La proliferación de MCF-7 aumentó con todas las concentraciones (1 a 10 U/ml; 1,5±0,2 a 1,25±0,2 veces de aumento, p<0,01 o p<0,001 vs. control). Se indujo apoptosis deprivando del medio condicionado (UT-7) o agregando forbol miristato acetato (PMA), 30 µg/ml durante 24 h (MCF-7), con o sin EPO, evaluando por citometría de flujo (FITC- anexina V e yoduro de propidio). La inducción en UT-7 redujo su viabilidad (fracción viable: 24,3± 4,3%, p<0,0001 vs. el control) y EPO las rescató, aumentando la fracción viable (51,3± 2,5%, p<0,001 vs las células en ausencia de EPO). El PMA redujo la viabilidad en MCF-7 y el agregado de EPO no lo previno (viabilidad de 40,8±3,2% y 45,9±3,9% respectivamente, ambos p<0,001 que el control sin PMA). Se detectó STAT5 fosforilado (STAT5-P) por western blot en lisados de UT-7 y MCF-7 con o sin EPO (5 min con 5 y 10 U/ml de EPO). Con ambas concentraciones de EPO se detectó STAT5-P en UT-7, pero no en MCF-7. En ninguno de los modelos estudiados se detectó diferencia entre ambas formulaciones de epoetina. Proponemos que estos modelos pueden ser de utilidad para comparaciones farmacodinámicas de estimulantes de la eritropoyesis.

NEUROCIENCIAS 5

403 (225) EXPOSICION A HERBICIDAS Y FUNCION MITOCONDRIAL EN CORTEZA CEREBRAL Y CUERPO ESTRIADO

Analía Czerniczyniec; Analia Karadayian; Juanita Bustamante; Silvia Lores Arnaiz
IBIMOL

El paraquat (1,1´-dimethyl-4,4´-bipyridinium dichloride) y la atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina) son herbicidas que han sido descriptos como tóxicos potenciales del sistema dopaminérgico tanto *in vivo* como *in vitro*. Las mitocondrias cumplen una función fundamental en el suministro de energía necesario para la excitabilidad y supervivencia neuronal. Así, el objetivo de este trabajo consistió en evaluar la funcionalidad mitocondrial luego del tratamiento crónico con paraquat (10 mg/Kg i.p.) o sub-crónico con atrazina (5 mg/Kg i.p.). El tratamiento con paraquat alteró el consumo de oxígeno mitocondrial en corteza cerebral y cuerpo estriado, que se refleja en una disminución del control respiratorio. En tanto, el tratamiento con paraquat disminuyó la actividad del Complejo I en un 25% y 34% en corteza y cuerpo estriado. Como consecuencia, la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en corteza cerebral y cuerpo estriado se incrementó en un 13% y 48%, respectivamente. Asimismo, el tratamiento con paraquat indujo una depolarización mitocondrial en ambas áreas cerebrales (25% y 22%). En el caso del tratamiento con atrazina, las determinaciones de H_2O_2 demostraron que cuando se utilizaron como sustratos malato y glutamato se observó un aumento significativo de H_2O_2 del 23% en mitocondrias de cuerpo estriado. Mientras que cuando el sustrato fue succinato, no se observaron cambios significativos. Por último, se observó una depolarización del 11% en mitocondrias de cuerpo estriado de ratas tratadas con atrazina. Ninguno de estos parámetros se encontró alterado en corteza cerebral luego del tratamiento con atrazina. Estos resultados sugieren que ambos herbicidas inducen disfunción mitocondrial que podría dar lugar a alteraciones en la bioenergética celular y consecuente muerte neuronal.

404 (370) MODELO DE INTOXICACIÓN AGUDA POR PARACETAMOL (APAP) SIN INSUFICIENCIA HEPÁTICA. EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA Y MARCADORES GLIALES EN ESTRIADO E HIPOCAMPO DE RATAS

María B Vigo[1]; María J Peréz[2]; María B Di Carlo[3]; Alejandra Scazziota[3]; José E Manautou[5]; Carolina I Ghanem[14]
ININFA[1] IQUIFIB-CONICET[2] Dpto.BioQuímica Clinica, FFYB. UBA[3] Cátedra de Fisiopatología. FFYB. UBA[4] Department of Pharmaceutical Sciences, University of Connecticcut, USA[5]

El daño cerebral por sobredosis de (APAP) se asocia a encefalopatía hepática, secundaria a una insuficiencia hepática aguda (IHA). Sin embargo reportamos que dosis tóxicas de APAP producen astrogliosis y muerte de precursores de oligodendrocitos (OPC) en cultivo primario de células gliales. Objetivo: Estudiar el efecto de una dosis hepatotóxica de APAP sin IHA sobre la conducta locomotora y los marcadores de células gliales en estriado (Es) e hipocampo (Hp) de ratas. Materiales y métodos: Ratas Wistar Macho (260-310g) se inyectaron i.p. con una dosis tóxica de APAP (1g/kg). Se estudiaron marcadores de lesión (ASAT/ALAT) y función (KPTT; TP; Factor V y amonio) hepática. Se estudió la actividad locomotora en un campo abierto. Se evaluó la expresión de marcador de astrositos (Gfap) y del linaje oligondendrocítico (PdgfR-alfa; SOX10 y MBP) en Es e Hp por WB. Resultados: Los valores de ASAT y ALAT se incrementaron un 200% y 110% en el grupo APAP, respectivamente (p<0.05). Sin embargo los marcadores de funcionalidad hepática KPTT, TP, FV y amonio no se modificaron por APAP. La distancia recorrida en 25 min fue un 53% menor en APAP (p<0.05). La expresión de Gfap se incrementó en un 70% y 199% en estriado e hipocampo del grupo APAP respectivamente (p<0.05). La expresión del marcador de toda la estirpe oligodendrocitica, SOX 10, no mostró diferencia significativa en Es e Hp (C:100±16; APAP:157±36 y C:100±5; APAP:159±35 respectivamente; n=4). El marcador de OPC, PdgfR-alpha, aumentó un 150% y un 262% en Es e Hp respectivamente (p<0.01). Mientras que el marcador del estadío maduro, MBP, no se modificó significativamente en Es (C:100±20;

APAP:70±7; n=4) y disminuyó un 50% en Hp de ratas APAP. Conclusión: Estos resultados demuestran que dosis tóxicas de APAP producen cambios conductuales y efectos tóxicos directos per se, sobre las células gliales caracterizados por astrogliosis y la disminución de oligodendrocítos maduros, independientemente de la función hepática.

405 (382) EFECTO PROTECTOR DEL ÁCIDO LIPOICO SOBRE CORTEZA VISUAL PRIMaría EN UN MODELO DE GLAUCOMA EXPERIMENTAL

Claudia G. Reides; Romina M. Lasagni Vitar; Fabián Lerner; Sandra M. Ferreira; Susana F. Llesuy
Cátedra de Química General e Inorgánica. IBIMOL, UBA-CONICET. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA

El glaucoma es una neuropatía óptica multifactorial caracterizada por la pérdida de células ganglionares retinales y atrofia del nervio óptico. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto protector del ácido lipoico (AL) frente al daño oxidativo en corteza visual priMaría (CV) en un modelo de glaucoma experimental. Se trabajó con 4 grupos de ratas Wistar (3 meses, n=16): grupo glaucoma (G), grupo glaucoma tratado con 100 mg de AL via i.p / kg de peso durante 7 días postquirúrgicos (GL), grupo control (C) y grupo control suplementado con AL (CL). A los 7 días de la cirugía se determinaron en homogeneizados de CV los siguientes parámetros: lipoperoxidación (TBARS), oxidación de proteínas (PO), capacidad antioxidante total (TRAP), tioredoxina reductasa (TR), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y superóxido dismutasa (SOD). Al comparar el grupo G con el C se observó un aumento de la lipoperoxidación (133%, p<0,001), un aumento en las PO (138%, *p<0,05*), una disminución del TRAP (50%, *p<0,05*), un incremento en la GPx (62%, *p<0,05*), una disminución en la TR (34%, *p<0,05*) y GR (61%, *p<0,05*), no registrándose cambios en la SOD. Cuando a G se lo trató con AL (GL), al comparar ambos grupos se observó una disminución no significativa de los TBARS, una disminución de PO (58%, *p<0,05*), un aumento del TRAP (108%, *p<0,05*), un incremento de la SOD (79%, *p<0,001*) y un aumento de la GR (408%, *p<0,001*). Se concluye que el tratamiento con 100 mg de AL/kg revierte los valores de TRAP y PO a los valores controles. El aumento en la SOD podría ser un mecanismo adaptativo para la protección del daño. El aumento de la GR incrementaría el glutatión reducido lo que aumentaría los niveles de TRAP. La terapéutica del glaucoma podría contemplar el uso de AL como una posible estrategia para la neuroprotección, considerando que el daño glaucomatoso se extiende a nivel cerebral más allá de la retina y del nervio óptico.

406 (386) DESARROLLO DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE GLAUCOMA FELINO

Pablo H Sande; Javier Alvares; Agustina Iaquinandi; Ruth Rosenstein
CEFYBO

El glaucoma es una disfunción ocular prevalente en felinos, caracterizada por la pérdida progresiva de las funciones visuales, que se correlaciona con la muerte de células ganglionares retinianas y excavación y atrofia de la papila óptica. El aumento de la presión intraocular (PIO) es el principal factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad. Existen diversos aspectos comunes para el glaucoma entre diferentes especies; sin embargo, fármacos que se utilizan en humanos o perros no son bien tolerados por los gatos. Por lo tanto, la elección terapéutica debería ser específica para esta especie. El desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el glaucoma felino depende en gran medida del uso de modelos experimentales específicamente desarrollados en esta especie, que al presente son muy limitados. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un modelo experimental de glaucoma felino. Para ello, gatos macho castrados europeos de pelo corto (4 - 6 kg, 5 ± 1 año de edad) fueron anestesiados y sometidos a la aplicación de 6 a 8 disparos de láser diodo (810 nm, 1500 mW, 5 segundos/disparo) en un cuarto de la superficie del ángulo iridocorneal, mediante una endosonda en cámara anterior; el ojo contralateral fue sometido a un tratamiento simulado. La aplicación de láser indujo un aumento significativo (P <0.01) y sostenido de la PIO desde el día 1 al día 28 post-cirugía con respecto a ojos controles. Hasta los 3 días post-cirugía se observó leve edema de córnea y midriasis intermedia y a los 28 días post-cirugía se observó una disminución significativa (P < 0.01) en el reflejo pupilar consensual, así como signos característicos de la degeneración glaucomatosa en la cabeza del nervio óptico. En suma, estos resultados indican que la aplicación de láser en el trabeculado reproduce aspectos centrales del glaucoma felino primario. Por lo tanto, este modelo podría constituir una herramienta útil en la búsqueda de nuevas terapias para esta enfermedad felina.

407 (422) CAMBIOS MITOCONDRIALES DE GANGLIO TRIGÉMINO EN RATAS INDUCIDOS CON CAPSAICINA EN MIGRAÑA EXPERIMENTAL

Ariel Balceda[13]; María Del Carmen Baez[13]; María De La Paz Scribano-Parada[12]; Federico Buonanotte[2]; Carla Buonanotte[2]; Sergio Blencio[1]; Maríana Tarán[1]; Mónica Moya[13]
Univ. Nac. de Córdoba, FCM, Cátedra de Física Biomédica. Univ. Nac. de La Rioja, Fac. Med, Física Biomédica[1] Servicio de Neurología, Hospital Nacional de Clínicas, FCM, UNC[2] Univ. Nac. de La Rioja, Fac. Med, Física Biomédica[3]

Introducción y objetivos: Migraña es una enfermedad neurológica caracterizada por accesos de cefalea hemicránea donde el estrés oxidativo tendría un papel determinante. Aunque la patogénesis no es bien conocida, se cree que los procesos oxidativos en los tejidos involucrados: ganglio y nervio trigémino; y vasos cerebrales, provocarían daño mitocondrial, los cuáles podrían ser, en parte, responsables de sensibilizar y perpetuar migraña. Confirmar esos daños sería de importancia para el estudio de su fisiopatología y tratamiento. Por ello, este trabajo tiene como objetivo evaluar en migraña experimental, en ratas, los posibles cambios histopatológicos mitocondriales en ganglio trigémino después de la estimulación trigeminal con capsaicina, un alcaloide nitrogenado.Material y Métodos: 12 ratas macho Wistar se dividiran en 2 gupos: control (A) y capsaicina 0,1mM x 3 c/72 h en región supraciliar (B). El material se obtendrá de ganglios trigéminos. El tejido será tratado con fijador Karnovsky, ultramicrótomo Jeol Jum-7 y acetato de uranilo en solución alcohólica y citrato de plomo. Serán observadas y fotografiadas en un microscopio electrónico Leo 906E.Resultados: Las microfotografías de células neuronales del grupo control (A) mostraron mitocondrias de aspecto normal, sin alteraciones de crestas ni dilatación de los espacios intermembranosos. En el grupo B se observaron, con respecto al control (A), mitocondrias con aumento del tamaño, dilatación del espacio intermembranoso y desorganización de crestas con vacuolización.Conclusiones: Los cambios se deberían a la mayor demanda de la actividad mitocondrial debido a capsaicina y al estado oxidativo inducido por fenómenos epiinflamatorios concomitantes. Ello sobrecargaría de óxido nítrico y calcio la matriz mitocondrial, generando lipoperoxidación en membranas. El daño a nivel de las membranas genera desorganización de las crestas. La vacuolización podría deberse a una mayor formación de agua en la matriz lo que aumenta el espacio intermembranoso. Estos resultados aportan evidencia sólida de que en migraña experimental se producirían alteraciones mitocondriales.

408 (441) SUPERVIVENCIA DE LOS FOTORRECEPTORES MEDIADA POR PROGESTERONA

Melisa D. Marquioni Ramella; Mariela C. Marazita; Pablo S. Tate; Angela M. Suburo
Universidad Austral, Fac. de Cs. Biomédicas

En diversas enfermedades retinianas la supervivencia de los fotorreceptores se encuentra afectada, y como las hormonas esteroideas pueden ser neuroprotectoras, se ha sugerido que la progesterona (PRG) podría ser beneficiosa. Para investigar los mecanismos de neuroprotección de PRG, estudiamos su efecto en dos modelos de degeneración de los fotorreceptores en ratón:

la degeneración fototóxica y la degeneración inducida por mifepristona (MFP), un bloqueante de los receptores de progesterona (PRG) y de glucocorticoides. Se emplearon ratones Balb/c machos (5-7 semanas) criados bajo iluminacíon cíclica (12 hs 60 lux - 12 hs oscuridad). En el modelo de fototoxicidad, los animales fueron expuestos a 1500 lux por 48 h. En el modelo MFP, los animales recibieron una dosis (10 mg/kg) de dicho compuesto. En ambos modelos, los grupos controles recibieron salina, mientras que los grupos tratados recibieron PRG, 1 o 2 mg/kg/día por 2 días. Para estudios de Western blot (WB), los animales fueron sacrificados a los 2 días, mientras que para medir el espesor de la capa nuclear externa (CNE) a los 7 días. Los WBs demostraron la presencia de caspasa 3 activada (CC-3) en ambos modelos de degeneración, pero no en los tratados con PRG. El regulador apoptótico Bcl-2 mostró un aumento en las retinas lesionadas, que se redujo en los tratados con PRG. Bcl-X_L desapareció en las retinas lesionadas por luz y por MFP, recuperándose totalmente en los animales tratados con PRG. El análisis de imagen en cortes histológicos coloreados con Rojo Neutro mostró una pérdida de núcleos de la CNE en ambos modelos de degeneración. En los animales tratados, la CNE mostró un espesor semejante al de los controles. Concluimos que la PRG es un neutroprotector de los fotorreceptores, cuya muerte evitó, tal como lo muestran la ausencia de CC-3, y la normalización de los niveles de los reguladores apoptóticos Bcl2 y Bcl-X_L. Asimismo, el tratamiento con PRG evitó la pérdida de núcleos de fotorreceptores.

409 (454) LIGANDOS DE INMUNOFILINAS FAVORECEN LA REPARACIÓN DE LESIONES DEL TEJIDO NERVIOSO

Cristina Del Rosario Daneri Becerra[1]; Nadia Romina Zgajnar[1]; Mario Daniel Galigniana[12]
IBYME[1] FAC. DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES[2]

Las inmunofilinas (IMMs) son una familia de proteínas solubles que unen las drogas inmunosupresoras ciclosporina-A (CsA) o FK506, clasificándoselas como CyPs y FKBPs, respectivamente. El tejido nervioso expresa ~10-50 veces más IMMs que otros, siendo su rol biológico poco conocido. Previamente demostramos que FK506 promueve la neurodiferenciación en líneas celulares y en cultivos primarios hipocampales, y que ambas drogas inmunosupresoras participan en la neurorregeneración y neuroprotección en cultivos organotipícos de cerebro. Lesiones de la médula espinal (SCI: *Spinal Cord Injuries*) generan pérdida de la función motriz, sensibilidad nerviosa y parálisis permanente. A ratones C57B7/6 y BALB/c machos se los sometió a SCI seguida de tratamiento diario con 0,1 mg/kg CsA ó FK506 (s.c.), o solvente para los controles. Se evaluó el comportamiento locomotor según el test Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) cada tres días durante dos semanas. Los animales fueron perfundidos con *p*-formaldheído para análisis histológico, y se evaluó la expresión de proteínas por Western blot. Mientras que la chaperona Hsp70 y las IMMs FKBP51 y CyPA se ven inducidas en todos los casos por CsA, FK506 induce fundamentalmente la expresión de FKBP52 en lóbulo prefrontal con la aparición de isoformas fosforiladas de FKBP51, mientras que en médula espinal su efecto es más amplio e induce a Hsp70, Hsp90, FKBP52, y formas fosforiladas de p23 y CyPA. Los cortes histológicos mostraron un incremento de la vascularización con FK506, y los ensayos BBB mostraron recuperación de la respuesta motriz y sensibilidad nerviosa, siendo éstas más eficientes en animales tratados con CsA para ese tiempo de tratamiento. Estos resultados permiten inferir un rol relevante in vivo del heterocomplejo p23-Hsp90-FKBP52 para tratamientos con FK506, mientras que Hsp70, FKBP51 y CyPA lo son para CsA.

410 (478) ROL DE LOS RECEPTORES DE VASOPRESINA Y CORTICOTROFINA EN LOS EFECTOS DE FLUOXETINA Y VENLAFAXINA SOBRE LA CONDUCTA RELACIONADA A LA DEPRESIÓN

María Belén Poretti[1]; Santiago Bianconi[1]; Mathias Rask-Andersen[3]; Marta Fiol De Cuneo[1]; Graciela Stutz[2]; Helgi B Schiöthb[3]; Mariela F Perez[4]; Valeria Paola Carlini[1]
INICSA, UNC-CONICET[1] Cátedra de Fisiología Humana, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba[2] Department of Neuroscience, Functional Pharmacology, Uppsala University, BMC, Sweden[3] Departamento de Farmacología, Instituto de Farmacología Experimental de Córdoba (IFEC-CONICET)[4]

En respuesta al estrés, la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la vasopresina (AVP) son liberadas del hipotálamo, activando sus receptores (CRHR1, CRHR2 o AVPr1b), para inducir la liberación de la hormona corticotropina (ACTH) de la pituitaria anterior. Con el fin de evaluar el papel de AVP y CRH en los efectos de fluoxetina y la venlafaxina sobre la expresión del comportamiento relacionado con la depresión, estudiamos el efecto de la administración crónica de fluoxetina (10 mg/kg/día) o venlafaxina (10 mg/kg/día) sobre la expresión génica de AVPr1b, CRHR1 y CRHR2 en pituitaria, y sobre los niveles plasmáticos de AVP, CRH y ACTH en una modelo animal de depresión (bulbectomía olfatoria bilateral (OB)). Además se analizó la participación de CRH y AVP en la respuesta conductual en el test de suspensión de cola (TST), empleando antagonistas específicos. Encontramos un aumento significativo en la expresión génica AVPr1b sólo en los animales OB-salina (control) ($p < 0,05$), los cuales también mostraron altos niveles plasmáticos AVP y ACTH ($p < 0,05$). El tratamiento con fluoxetina o venlafaxina disminuyen los niveles plasmáticos AVP y ACTH ($p < 0,05$) en los OB. Los niveles plasmáticos de CRH fueron similares en ratones sham y OB ($p < 0,05$). Nuestros resultados sugieren que la terapia antidepresiva empleada modula la vía AVP, ya que se encontró una correlación positiva entre los niveles de APV y la respuesta conductual en los animales OB. Además ratones OB-fluoxetina, pero no OB-venlafaxina mostraron bajo nivel plasmático de CRH aunque ambos tuvieron respuesta similar conductual de tipo antidepresiva en el TST.

411 (483) MODULACIÓN EPIGENÉTICA DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN LA LÍNEA CELULAR MICROGLIAL BV2POR EXPOSICIÓN AGUDA AL ETANOL

Fernando Correa; Andrea De Laurentiis; Ana María Franchi
CEFYBO

La microglía cumple un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis del sistema nervioso central y constituyen la primera línea de la respuesta inmune innata. El sistema endocannabinoide (SEC) ha sido identificado como un participante clave en la modulación de la respuesta microglial y alteraciones en el mismo podrían impactar sobre el proceso de activación. Por otra parte, diversos estudios asocian al consumo de bebidas alcohólicas con un incremento de la reactividad microglial. Por ello, nuestro objetivo fue estudiar el efecto del etanol sobre la expresión microglial del SEC así como los posibles mecanismos moleculares involucrados. Como primera aproximación, determinamos el efecto de la exposición aguda al etanol (100mM por 24 h) sobre la expresión proteica y del ARNm de los principales componentes del SEC de células BV2 en cultivo, observándose cambios en la expresión de NAPE-PLD (enzima de síntesis), CB1 (receptor) y FAAH (enzima de degradación) ($p<0.05$). Únicamente la disminución de la expresión de NAPE-PLD se mantuvo por 48 h post-exposición al etanol, sugiriendo la posible participación de mecanismos epigenéticos en este efecto. A continuación analizamos posibles vías moleculares asociadas a dichos efectos, encontrándose tanto una activación de ERK1/2 como un aumento de los niveles intracelulares de AMPc. Las inhibición de ambas vías no solo revirtió los efectos del etanol sobre la expresión de NAPE-PLD ($p<0.05$), sino que además revirtió la activación del factor de transcripción CREB ($p<0.05$). Asimismo, se observó que la exposición aguda al etanol modifica el patrón de acetilación de la histona 3 ($p<0.05$). Por otra parte, la inhibición farmacológica de las vías de ERK1/2 y de AMPc/PKA revirtieron los efectos del etanol sobre los niveles de acetilación de histona 3 ($p<0.05$). Estos resultados sugieren que el etanol ejerce sus efectos moduladores sobre el SEC mediante mecanismos epigenéticos.

412 (541) EFECTO PROTECTOR DE LOS RECEPTORES X PARA RETINOIDEOS (RXR) SOBRE FOTORRECEPTORES EN UN MODELO DE RETINITIS PIGMENTOSA

Olga Lorena German[12]; Yanel Volont[12]; Andres Garelli[12]; Pilotti Fiorella[2]; Nora Rotstein[12]; Luis Politi[12]
INIBIBB[1] Univ. Nac. del Sur[2]

En las enfermedades neurodegenerativas de la retina, los fotorreceptores (FR) degeneran progresivamente por apoptosis causando ceguera en forma irreversible. Hemos demostrado que la activación de los receptores nucleares para retinoides X (RXR) promueve la supervivencia de los FR de retina de rata en modelos de neurodegeneración *in vitro*. Estudiamos aquí en un modelo murino de Retinitis Pigmentosa, el ratón *rd*, si hay cambios en la expresión y/o localización de los RXR y si la activación de los RXR promovería la supervivencia de los FR. Para ello preparamos cortes de retina y cultivos neurogliales de retina de ratones *rd* y controles (*wt*). A distintos días analizamos la expresión y localización de los RXR mediante microscopia confocal. En los cultivos neurogliales de retina de ratones *rd* evaluamos la apoptosis neuronal mediante TUNEL y DAPI. Investigamos el efecto protector de la activación de los RXR sobre los FR *rd* tratando a los cultivos con diferentes agonistas sintéticos y evaluamos apoptosis. Evidenciamos un cambio en la localización intracelular de los RXR en las células gliales no así en los FR con el tiempo, pasando de una localización nuclear a nuclear y peri-nuclear, que ocurrió más tempranamente en los cultivos *rd* respecto de los *wt*. Asimismo no se observaron cambios en la expresión de los RXR en los cortes de retina *rd* vs *wt* a partir de PN14. En los cultivos *rd* el porcentaje de neuronas apoptóticas fue mucho mayor que en los *wt*, incrementándose en ambos con el tiempo en cultivo. El tratamiento con el agonista PA024 0,1 µM retrasó la apoptosis de los FR en los cultivos *rd*, disminuyendo el porcentaje de células con núcleos picnóticos respecto al de células con fragmentación nuclear. Estos resultados preliminares sugieren que el cambio en la localización de los RXR en las células gliales *rd* está acelerado respecto del *wt* y que la activación de los RXR postergaría el inicio de la muerte por apoptosis de los FR en el modelo *rd in vitro*.

413 (560) EVALUACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE COENZIMA Q EN AUTISMO. ESTUDIO PRELIMINAR

Paula Samassa[1]; Manuela Martinefski[1]; Maríanela E. Traetta[2]; Nonthué A. Uccelli[2]; Analia Reines[23]; Valeria Tripodi[13]
Dpto Tecnologia Farmaceutica, FFyB, UBA[1] Instituto de Biología Celular y Neurociencias Prof E De Robertis[2] CONICET[3]

El autismo es un espectro de trastornos del neurodesarrollo, de etiología desconocida, que se presenta dentro de los tres años luego del nacimiento; probablemente asociado a la interacción entre una vulnerabilidad genética y factores ambientales. Numerosos estudios sugieren que existe un incremento del estrés oxidativo en esta patología y que el mismo, asociado a una disfunción mitocondrial, podría contribuir a su desarrollo. Un componente clave para la producción de energía celular a nivel mitocondrial es la coenzima Q (CoQ), que facilita la transferencia de electrones en la cadena respiratoria. La CoQ es también un poderoso antioxidante endógeno capaz de proteger lipoproteínas circulantes y membranas celulares contra el daño oxidativo. Su deficiencia se asocia a patologías degenerativas neuromusculares, entre otras. En este trabajo se evaluaron los niveles plasmáticos de CoQ9 (coenzima Q mayoritaria en murinos) en un modelo animal de autismo en comparación con un grupo control. Se utilizaron ratas hembras nulíparas de la cepa Wistar de 250 g de peso corporal y 3 meses de edad. El modelo consistió en una única administración de ácido valproico (VPA; 500 mg/kg, i.p.) a las hembras gestantes (E 10,5). Las hembras control recibieron solución fisiológica en lugar de VPA. Se conformaron dos grupos: grupo control (crías hembras de madres que recibieron solución fisiológica, n=10) y grupo VPA (crías hembras de madres que recibieron VPA, n=8). El fenotipo VPA se confirmó mediante pruebas conductuales. La evaluación de los niveles plasmáticos de CoQ9 se determinó por microHPLC-UV. Los resultados preliminares indican una disminución significativa de los niveles de CoQ9 en el grupo VPA respecto del control (0,23 ± 0,01µM vs 0,31 ± 0,03µM, p<0,05, X ± SEM, respectivamente). Estos resultados constituyen el primer paso para considerar evaluar el comportamiento de los animales VPA luego de la administración terapéutica de CoQ.

414 (637) ALTERACIÓN EN EL FACTOR TRÓFICO DE NEURONAS COLINÉRGICAS DURANTE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y SÍNDROME DE DOWN

María Beatriz Bistué Millón[13]; Florencia Iulita[2]; A. Claudio Cuello[2]; Martin Alejandro Bruno[123]
Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Ciencias Médica, Universidad Católica de Cuyo[1] Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montreal, Quebec, Canada[2] CONICET[3]

Las neuronas colinérgicas presentes en los núcleos basales del cerebro que proyectan sus terminaciones nerviosas a la corteza cerebral son altamente dependientes del suministro del factor de crecimiento nervioso (NGF) tanto para el mantenimiento de su fenotipo como de la integridad de sus conexiones y terminales sinápticos. La forma precursora del NGF, proNGF, es la principal forma en que se encuentra ésta neurotrofina en el sistema nervioso central (SNC), dónde paradójicamente sus niveles están muy elevados en la enfermedad de Alzheimer (EA) y en Síndrome de Down (SD). Con el fin de obtener una comprensión más profunda acerca de la función trófica del NGF en el mantenimiento de las neuronas colinérgicas, hemos realizado una serie de investigaciones "*in vivo*" (con animales de experimentación) y "*ex vivo*" (tejido cerebral de pacientes con EA y SD). Revelamos la vía metabólica del NGF, describiendo mecanismos de su liberación, su maduración, su degradación y el importante rol trófico que desempeña el NGF maduro en el mantenimiento de las neuronas colinérgicas basales, así como también las alteraciones metabólicas que hacen que se encuentre desregulado en la EA y en SD. En el presente proyecto, hemos descubierto que el precursor de NGF (proNGF) es liberado en forma glicosilada, tanto en ratas experimentales de EA como en corteza cerebral y liquido cefalorraquídeo de pacientes con EA y SD con diagnóstico de EA. El mismo se encuentra aumentado en forma aberrante, correlacionándose esto con una disminución significativa en tPA (activador cerebral de plasminógeno), furina (enzima que madura al proNGF intra-neuronal) y TIMP-1 (inhibidor de la enzima que degrada extra-neuronalmente al NGF maduro, MMP-9). El deterioro progresivo de las neuronas colinérgicas durante la EA transcurre con una alteración de los mecanismos encargados de proveer del suministro trófico a las mismas, abriendo una posible ventana terapéutica experimental.

415 (97) ANALISIS DE LA FRACTALIDAD EN VARIABLES RESPIRATORIAS EN SUJETOS NORMALES Y EN ESTADO VEGETATIVO PERSISTENTE

Carlos Dnegri[12]; Eduardo Luis De Vito[123]; Santiago Arce[1]; Gastón Morel Vulliez[3]; Miguel Escobar[3]
IDIM[1] CONICET[2] Clinica del Parque[3]

Las estructuras espaciales o temporales caracterizadas por la auto-similitud se denominan 'fractales' (FRACT). El patrón respiratorio (PR) es fractal. Objetivo: Cuantificar la FRACT VT/TI, TI y FR de normales (N) y en estado vegetativo persistente (EVP) por lesión difusa (D) o focal (F). Hipótesis: diferente FRACT entre grupos y posible degradación de generadores de ritmo. Mètodo: Piloto y exploratorio. Se obtuvo flujo aéreo (~1 h) en N (n=14 25-66a) y EVP (D=10 19-69a, F=12 22-83a), con VE Estacionaria (D'Negri et al, Medicina 2011). En Ti y VT/TI se hizo análisis dispersional según: Disp(n)=std[media(XX)i](n) (XX:Ti o VT/TI) en c/grupo de n respiraciones del tacograma; y en FR el factor Fano F(T)=var[Ni(T)]/media[Ni(T)] con T la segmentación temporal de todo el tacograma y Ni(T) número de respiraciones por segmento T. La condición FRACT es preservar la misma dependencia de F o Disp a distintas escalas de n y T respectivamente. Resultados: Las 3 FRACT tienen 8 combinaciones. Su distribución por grupo no difirió de la uniforme aunque globalmente sí p<0.001 (Chi2). Predominantemente se observa FRACT en FR,TI y VTTI simultáneas y FR y TI en todos los grupos (8 de 14 en N, 5 de 5 en D y 7 de 12 en F). Ausencia de FRACT completa se dio en un caso

de cada grupo. La FRACT en la FR estuvo presente en N (13 de 14), en D (7 de 10) y en F (9 de 12). El seguimiento intrasujeto (n 4) sobre 2 D y 2 F (entre 2 y 7 años) hubo pérdida FRACT en TI (n 3), VT/TI(n 1) y FR (n 1). Conclusiones: La condición D y F no se reflejó en otra distribución diferente de la de los N lo que parece conferirle cierta robustez a esta distribución. La pérdida de FRACT con el tiempo en los D y F justificaría la aparición de combinaciones que los N no parecen tener. La repetición del PR en N podría clarificar si su 'plantilla' de FRACT es estable o sus generadores tienen la facultad de 'prenderse' y 'apagarse' ante estímulos endógenos y/o exógenos tanto en N como en presencia de patologías.

ENDOCRINOLOGÍA 4

416 (32) ROL DE LA IL-6 EN LA SENESCENCIA INDUCIDA POR ONCOGENES EN TUMORES HIPOFISARIOS

Melanie Sapochnik[1]; Maríana Fuertes[1]; Sergio Senin[1]; Eduardo Arzt[12]
Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires-CONICET-MPSP[1] Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular, FCEyN, UBA[2]

Los tumores hipofisarios son neoplasias mayormente benignas, de crecimiento lento y raramente progresan en malignidad, indicando que existirían mecanismos que frenan su desarrollo. Se sabe que la senescencia inducida por oncogenes (OIS) detiene la transformación maligna en distintos tumores y que ciertas citoquinas (como IL-6) están involucradas en dicho mecanismo. En la hipófisis IL-6 de forma paracrina induce la proliferación de células tumorales mientras que la inhibe en células normales. Con estos antecedentes, caracterizamos la línea tumoral hipofisaria MtT/S como modelo de senescencia *in vitro* mediante determinación de marcadores específicos, como la β-galactosidasa asociada a senescencia (SA-β-gal) y proteínas reguladoras del ciclo celular, como p16 y pRb. Establecimos clones de células MtT/S silenciados para IL-6 (MtT/S shIL-6), observando en ellos una actividad reducida de SA-β-gal ($p<0,05$), menor expresión de p16 y mayor de pRb, y una mayor proliferación e invasión celular ($p<0,05$), respecto a las células control (MtT/S *scramble*). Habiendo observado previamente en el laboratorio que las células MtT/S no desarrollan tumor al ser inyectadas en ratones *nude*, lo cual confirmamos inyectando las MtT/S *scramble*, inyectamos las MtT/S shIL-6 (2 series independientes de 4 ratones) y observamos que las mismas forman tumores entre los 46-60 días. Este resultado está indicando que dichos clones, que escapan de la senescencia *in vitro*, son capaces de inducir tumorigénesis. Evaluamos el efecto del silenciamiento de IL-6 sobre los marcadores de senescencia en los tumores formados y comparamos los mismos con tumores de células MtT/S *scramble* coinyectadas con células TtT (células tipo folículo estrelladas, productoras de IL-6). Observamos que los tumores desarrollados por los clones silenciados presentaron menor expresión de p16 y mayor de pRb. Analizamos asimismo senescencia en cultivos de tumores hipofisarios humanos (n=53), observando actividad de SA-β-gal en 39 adenomas, y que dicha actividad se ve inhibida al silenciar IL-6. Estos hallazgos demuestran la participación de IL-6 autócrina en la senescencia tumoral hipofisaria, que podría contribuir a la naturaleza benigna y bajo índice mitótico de estos tumores. Apoyado por ANPCyT, CONICET,UBA, FOCEM (COF 03/11)

417 (64) ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE HISTIDINA DESCARBOXILASA EN CÉLULAS DE LEYDIG TUMORALES R2C Y TUMORES DE CÉLULAS DE LEYDIG HUMANOS

Adriana María Belén Abiuso[1]; Alejandra Lucía Marcos[1]; Alicia Belgorosky[2]; Marco Aurelio Rivarola[2]; Marcos Besio Moreno[1]; Omar Pedro Pignataro[1]; Esperanza Berensztein[2]; Carolina Mondillo[1]
Lab de Endocrinología Molecular y Transducción de Señales - IBYME- CONICET[1] Servicio de Endocrinología - Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan[2]

La incidencia de tumores de células de Leydig (TCL) se ha incrementado en los últimos años. A nivel nacional, el rango de edad más afectado es de 11 a 25 años. Si bien los TCL son normalmente benignos, en niños puede presentarse pubertad precoz, y cuando malignizan en el adulto no responden a la quimioterapia ni radioterapia. Aunque la etiología de los TCL es desconocida, diversos estudios apuntan a la sobreexpresión de CYP19 en las células de Leydig tumorales (CLT) y el aumento en la síntesis de estradiol (E2), que a su vez estimula la proliferación celular (PC). El IGF-1 también actuaría como factor de crecimiento autócrino en las CLT. Previamente describimos el efecto proliferativo de la histamina (HA) y la sobreexpresión de histidina descarboxilasa (HDC) en CLT MA-10. Dado que en las CLT MA-10 la esteroidogénesis se interrumpe a nivel de progesterona (P), en este trabajo extendimos nuestro estudio a las CLT R2C, que expresan CYP19 y sintetizan E2 e IGF-1. También evaluamos la expresión de HDC en TCL humanos *vs* testículos humanos normales (THN). Metodología: La expresión de HDC en las CLT R2C se estudió por Western blot. Los niveles de P y E2 se determinaron por RIA y la PC se evaluó por incorporación de ^{3}H-timidina. Se estudió la expresión de HDC por inmunohistoquímica en 9 THN de 4 grupos etarios (G): G1 (neonatal,n=2), G2 (infantil,n=1), G3 (juvenil,n=3) y G4 (puberal,n=3), y en 5 TCL. Resultados: Se observó elevada expresión de HDC en las CLT R2C, y un aumento en presencia de IGF-1 100ng/ml ($p<0,001$;n=3). HA 1nM estimuló la PC y potenció el efecto proliferativo del IGF-1 ($p<0,05$ HA+IGF-1 *vs* IGF-1). Además, los inhibidores de HDC α-metil-DL-histidinadihidrocloruro y galato de epigalocatequina inhibieron tanto la PC como la síntesis de P y E2. Finalmente, detectamos HDC en todos los TCL, pero sólo en las CL y células germinales de 2 THN de G4. Conclusión: Los resultados sugieren que HDC constituye un potencial blanco terapéutico para el tratamiento de TCL.

418 (304) LA ACTIVACIÓN β-ADRENÉRGICA INDUCE LA RAMIFICACIÓN DE DUCTOS MAMARIOS MURINOS

Lucía Gargiulo; María May; Ezequiel Rivero; Caroline Lamb; Claudia Lanari;Isabel Luthy; Ariana Bruzzone
IBYME

La mama es un órgano que sufre cambios en tamaño, forma y función asociados a la pubertad, el embarazo, la lactancia y la menopausia. Si bien su desarrollo comienza en la embriogénesis, la mayor parte ocurre bajo el control de las hormonas reproductivas femeninas, como los estrógenos y la progesterona. Anteriormente demostramos que la activación β-adrenérgica con isoproterenol (Iso) induce la diferenciación de las células no tumorales de mama humana MCF-10A en cultivo 3D. En este trabajo, nos propusimos evaluar el efecto del Iso en el desarrollo de la glándula maMaría *in vivo*. Para ello se utilizaron ratones hembras vírgenes Balb/c al destete y adultas inyectadas durante 15 días con solución fisiológica (control) o con Iso 1mg/Kg/día. Al sacrificio, la mama derecha se utilizó para Whole Mount y la izquierda se incluyó en parafina para estudios histológicos. Se evaluó la vía del FGF debido a su rol en desarrollo mamario por inmunohistoquímica (IHQ) y por Western Blot (WB). Se analizó el efecto del Iso en ratones ovariectomizados, tratados con fulvestrant a fin de regular el receptor de estrógenos (RE) y en ratones KO para el receptor de progesterona (PR). El Iso aumentó significativamente el número de ductos mamarios en ratones púberes (196±16 vs 94±14 $p<0.01$), así como en ratones al destete. El tratamiento no interfiere en parámetros reproductivos de tipo funcional (paridad, peso de las crías, lactancia). A su vez, observamos que el efecto del Iso sobre la ramificación se anula en ausencia de estrógenos o de su receptor, pero no en ausencia del PR (KOPR: 114 ±10 Iso vs 49±7 $p<0.05$). Mediante IHQ, demostramos que el Iso induce la expresión de Efrina-B1, FGF2, FGF10 y FGF2R *in vivo*. El aumento en la expresión de FGF fue observado también *in vitro* mediante WB en MCF-10A. Por lo tanto, la activación β-adrenérgica induce el desarrollo de la glándula maMaría *in vivo*. El efecto sobre la ramificación de los ductos mamarios depende de la presencia del RE.

419 (344) PARTICIPACIÓN DE LAS VÍAS JAK2/STAT5 Y MEK EN LOS EFECTOS APOPTÓTICO *Y ANTIPROLIFERATI-*

VO DE LA PROLACTINA SOBRE CÉLULAS ADENOHIPOFISARIA

Nataly De Dios[1]; Martín Irizarri[1]; Santiago Jordi Orrillo[1]; María Florencia Gottardo[1]; Maríanela Candolfi[1]; Adriana Seilicovich[1]; Vincent Goffin[2]; Daniel Pisera[1]; Jimena Ferraris[1]
INBIOMED[1] Institute Necker des Enfantes Malades, INSERM U845, Paris, France[2]

Nuestro objetivo es identificar las vías de señalización mediante las cuales la PRL induce apoptosis e inhibe la proliferación de células adenohipofisarias. Evaluamos la participación de JAK2/STAT5 y MEK/ERK, vías asociadas a la activación del receptor de PRL (RPRL), sobre estas acciones. Para estudiar si los efectos auto/paracrinos de la PRL dependen de JAK2, células GH3 (somatolactotropos) que secretan de manera constitutiva PRL, fueron incubadas en presencia de un inhibidor de JAK2 (AG460 100µM, iJAK2, 6 hs) y/o de un antagonista de RPRL (Δ1–9-G129R-HPRL, 5µg/ml, aRPRL, 6h). Tanto el iJAK2 como aRPRL redujeron el porcentaje de células apoptóticas (TUNEL e hipodiploidía), mientras que la presencia de ambos indujo una disminución mayor de la apoptosis respecto de los tratamientos individuales (TUNEL: C 8.8%, aRPRL 0.6, iJAK2 5.9, aRPRL+iJAK2 0.3, $p<0.01$, χ^2), lo que sugiere que ambas señales actúan en forma independiente. En otros experimentos, las células fueron preincubadas con aRPRL (16 hs) y luego tratadas con o sin aRPRL por 6 h. En presencia de iJAK2, la PRL secretada durante las últimas 6 h indujo apoptosis de células GH3 ($p<0.05$, ANOVA), fortaleciendo la hipótesis de que, si bien la vía de JAK2 es proapoptótica, el efecto apoptótico de la PRL es independiente de su activación. Por otro lado, la presencia del iJAK2 impidió el aumento de la proliferación de células GH3 (células BrdU+) inducido por el aRPRL ($p<0.01$, χ^2), por lo que JAK2 estaría involucrada en el efecto de PRL sobre la proliferación de estas células. Además, el aRPRL incrementó la fosforilación de STAT5 (evaluada por inmunofluorescencia) ($p<0.01$, χ^2), sugiriendo que la PRL inhibe su fosforilación en células GH3. Por otro lado, aRPRL incrementó la proliferación de células GH3 tanto en presencia como en ausencia de un inhibidor de MEK (PD98950, 5µM, 6 hs) ($p<0.01$, χ^2), indicando que el efecto de PRL sobre la proliferación de células adenohipofisarias es independiente de esta quinasa.

420 (69) HIPERACTIVACIÓN DEL EJE HIPOTÁLAMOHIPÓFISO-ADRENAL (HHA) INDUCIDA POR UNA DIETA RICA EN SACAROSA (DRS): ROL DEL ESTRÉS OXIDATIVO (EOX) Y LA INFLAMACIÓN

Matias Nicolas Perez; María Elisa Mercau; Juan Salvador Calanni; Marcos Aranda; Ruth Rosenstein; Silvia Sanchez Puch; Esteban Martín Repetto; Cora Beatriz Cymeryng
Laboratorio de Endocrinología Molecular, Departamento de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, CEFYBO-CONICET

En estudios previos demostramos que los niveles plasmáticos de ACTH y la expresión de sistemas antioxidantes y marcadores de macrófagos aumentan en la adenohipófisis (AH) de ratas tratadas con una DRS durante 3 semanas. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del tratamiento antioxidante (AOx) sobre los parámetros mencionados. Ratas Wistar macho adultas fueron distribuidas al azar en los siguientes grupos: C (control), DRS (sacarosa al 30% en el agua de bebida), ALA (ácido α-lipoico 100mg/kg/48 hs,i.p.), MEL (2 implantes de melatonina, 20mg/implante s.c.) y DRS+ALA o DRS+MEL. Luego de 3 semanas de tratamiento se evaluó la sensibilidad periférica a insulina y se obtuvieron muestras de plasma y AH para su análisis. No se observaron alteraciones significativas en la insulinosensibilidad en ninguno de los grupos evaluados con respecto a C. Los tratamientos AOx no previnieron el aumento de la glucemia y trigliceridemia generado por la DRS, pero evitaron el incremento de parámetros de EOx (TBARS y actividad de catalasa) en AH. Observamos también un aumento en la expresión de marcadores de infiltración macrofágica (F4-80 e Iba-1) y de TNFα en las AH del grupo DRS, que fue prevenido por los AOx (TNFα: C: 1.0±0.1, DRS: 2.2±0.1[a], ALA: 0.3±0.1[a,b], DRS+ALA:0.3±0.1[a,b] U.A. [a]$p<0.001$ vs. C, [b]$p<0.001$ vs. DRS). Por último, el tratamiento AOx previno el incremento en los niveles circulantes de ACTH y corticosterona (C:21.9±2.3, DRS:34.2±3.4[c], MEL:22.0±3.6[d], DRS+MEL: 22.1±2.4[d] ng/ml. [c]$p<0.05$ vs. C, [d]$p<0.05$ vs. DRS). Los resultados obtenidos sugierenque el consumo de DRS produce EOx en AH, lo que podría inducir un perfil pro-inflamatorio en este tejido. Estos mecanismos estarían involucrados en los efectos de la DRS sobre la síntesis y secreción de ACTH. Nuestros resultados sugieren también que la desregulación del eje HHA generada por el consumo de DRS es previa al desarrollo de la insulinorresistencia.

421 (345) RATONES DEFICIENTES EN IGF1 HEPÁTICO PRESENTAN MENOR ACTIVACIÓN DE LA SEÑAL DE INSULINA EN CORAZÓN

Nadia V Muia[1]; Marina C. Muñoz[1]; Carolina S. Martinez[1]; Verónica G. Piazza[1]; Gregorio Mc Callum[1]; Daniel Turyn[1]; Patricia A. Pennisi[2]; Johanna G. Miquet[1]
IQUIFIB (UBA CONICET) FAC. DE FARMACIA Y BIOQuímica - DPTO. Química BIOLOGICA[1] CENTRO DE INVESTIGACIONES ENDOCRINOLOGICAS (CEDIE) CONICET - HOSPITAL DR. RICARDO GUTIERREZ[2]

Ratones transgénicos que sobreexpresan GH presentan hipertrofia y fibrosis cardíaca, aumento de la presión arterial, hiperinsulinemia e insulinorresistencia. En un estudio previo describimos que estos animales poseen alterada la capacidad de activación de la vía de señalización PI3K/Akt en respuesta a la insulina en corazón. Debido a que en este modelo aumentan crónicamente GH e IGF1, es difícil establecer el aporte de cada hormona a las alteraciones descriptas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto que la exposición prolongada a niveles elevados de GH, pero no de IGF1, ejerce en corazón, centrándonos en la señalización intracelular de la insulina. Para ello, se utilizaron ratones LID (liver IGF1 deficient) que, al no expresar IGF1 en hígado, presentan una marcada reducción de IGF1 en circulación, hecho que ocasiona hipersecreción de GH. Estos animales presentan hiperinsulinemia y menor sensibilidad a la insulina en músculo esquelético, pero no hay estudios hasta el momento que analicen la sensibilidad a la insulina en tejido cardíaco. Mediante técnicas de inmunoprecipitación e inmunobloting se determinó la activación de mediadores de señal de insulina en corazón. En los ratones LID un estímulo agudo con insulina produjo menor activación de la señal que en los ratones controles, que se evidenció a nivel de la fosforilación del receptor de insulina en los residuos Tyr972 y Tyr1158, del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS1) en Tyr612 y de Akt en Ser473 y Thr308 ($P<0,05$, n= 3-8). Si bien los ratones LID presentaron una disminución en la sensibilidad a la insulina en corazón, no se detectó hipertrofia cardíaca en los mismos, a diferencia de lo observado en ratones transgénicos que sobreexpresan GH. Esto sugiere que el aumento crónico de IGF1 tendría un rol importante en la hipertrofia cardíaca que se observa en la acromegalia, mientras que la exposición prolongada a la GH ocasionaría alteraciones en la sensibilidad a la insulina en corazón.

GASTROENTEROLOGÍA 2

423 (82) VMP1 COMO INTERMEDIARIA ENTRE LA INDUCCIÓN Y LA PROGRESION ESTRUCTURAL DE LA ZIMOFAGIA

Daniel Grasso; Tamara Orqueda; Alejandro Ropolo; María Inés Vaccaro
IBIMOL (UBA-CONICET), Cát. Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

La pancreatitis aguda (PA) es causada por la activación prematura de los gránulos de zimógenos (GZ). Esto produce la autodigestión de la glándula, con respuesta necro-inflamatoria que puede conducir a la muerte. La mayoría de las PAs son autolimitadas, evidenciando la importancia de los mecanismo de respuesta al estrés de las células acinares pancreáticas. Hemos descripto la autofagia selectiva de los GZ activados durante la PA, denomina-

da zimofagia. La zimofagia es mediada por VMP1 y es capaz de prevenir y contener los efectos injuriosos de la activación de los GZ. El objetivo fue entender la dinámica de VMP1 en el proceso autofágico. Determinamos que VMP1 se encuentra inicialmente en el ER como estructura pre-autofagosomal, colocalizando con marcadores de la vía de señalización (ULK1) y de la estructura autofagosomal (LC3, WIPI2). Probamos que un porcentaje de los autofagosomas mediados por VMP1 pasan a través de anfisomas, pero el complejo PI3K reclutado por el dominio AtgD de VMP1 es específico del autofagosoma. Además VMP1 prosigue en la membrana autofagosomal hasta la fusión con el lisosoma. Analizando posibles modificaciones postraduccionales de VMP1, construimos mutantes de sitios seleccionados. De estos destaca la fosforilación en Thr25. La dominante negativa (T25A) es incapaz de gatillar autofagia, mientras la constitutivamente fosforilada (T25D) dicha capacidad está incrementada. Por otra parte, VMP1 deficiente de AtgD fué incapaz de reclutar al complejo PI3K e incluso de salir del ER. Sin embargo, ésta colocaliza con ULK1. Los resultados sugieren que VMP1 posee al menos dos regiones funcionales separadas, la Nt probablemente fosforilada por ULK1 y el nexo con la vía de señalización y el Ct asociado al reclutamiento del complejo PI3K necesario para el progreso estructural de la formación del autofagosoma. Proponemos que VMP1 posee un papel como plataforma y acoplante entre la inducción de la autofagia y la formación del autofagosoma.

424 (193) IGFR PARTICIPA EN LA ALTERACIÓN DEL TRANSPORTADOR MRP2 INDUCIDA POR ESTRADIOL-17ß-D-GLUCURÓNIDO (E17G) A TRAVÉS DE LA VÍA GPR30/PI3K EN DUPLAS AISLADAS DE HEPATOCITOS DE RATA (DAHR)

Ismael Ricardo Barosso; Nadia Ciriaci; Romina Adermatten; Gisel Miszczuk; Diego Taborda; Fernando Crocenzi; Enrique Sánchez Pozzi
Instituto de Fisiología Experimental CONICET UNR

E17G induce la internalización del transportador Mrp2 activando varias vías de señalización. E17G activa PI3K cascada abajo de GPR30 por un mecanismo dependiente de microtúbulos. Dado que IGFR puede activarse por receptores acoplados a proteínas G e interactúa con PI3K, se evaluó si IGFR media la activación de PI3K producida por GPR30 en la colestasis inducida por E17G. Metodología: DAHR fueron pre-tratadas con Tyrphostin AG1024 (Tyr, 100nM, inhibidor IGFR) o Wortmanina (W, 100nM, inhibidor PI3K) y tratadas con E17G (100µM). Segundo: DAHR fueron incubadas con IGF (1nM) junto con W o G15 (10nM, antagonista GPR30), Se determinó la acumulación vacuolar canalicular (AVc) de glutatión metilfluoresceína (sustrato de Mrp2). Para evaluar el rol de los microtúbulos, se utilizó colchicina (Col, 1µM) antes de la adición de los inhibidores. La activación de IGFR y AKT (efector de PI3K) se midió por western blot (WB), determinando sus formas fosforiladas (IGFR-P Tyr1131, AKT-P Ser473). Resultados (% del control±EE, n=3-5, $p<0.05$): AVc: E17G (51±2a), W+E17G (77±5a,b), Tyr+E17G (78±2a,b), W+Tyr+E17G (84±6a,b), G15+E17G (82±4a,b). IGF no alteró la protección por W (W+IGF+E17G: 76±6a,b), mientras que previno la protección por G15 (G15+IGF+E17G: 67±2a,b,c). Con Col: E17G (49±3a), W+E17G (63±6a,d), Tyr+E17G (51±6a,d), W+Tyr+E17G (52±3a,d). WB: E17G indujo la activación de IGFR (198±14%a) y AKT (246±23%a), G15 previene la activación de IGFR por E17G (86±25%b) mientras que Tyr previene la activación de AKT por E17G (164±26%b). a significativamente diferente de Ctrol; b significativamente diferente de E17G, c significativamente diferente G15+E17G, d significativamente diferente del grupo sin Col. Conclusión: IGFR participa en la alteración de Mrp2 inducida por E17G por un mecanismo dependiente de microtubulos y comparte la vía GPR30/PI3K (no se observa efecto sumatorio). La acción de IGF y los WB muestran que la activación de IGFR es anterior a PI3K y posterior a GPR30.

425 (343) UNA MAYOR CAPACIDAD PROLIFERATIVA Y MENOR INDUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO PROTEGEN DE LA FIBROSIS HEPÁTICA A RATONESKNOCKOUT PARA SPARC (SECRETED PROTEIN, ACIDIC ANDRICH IN CYSTEINE)

Estanislao Peixoto[1]; Catalina Atorrasagasti[1]; Alejandrina Real[1]; Marcelo Rodríguez[1]; Maríana Malvicini[1]; Maríana Garcia[1]; Esteban J. Fiore[1]; Fernando Corrales[2]; Guillermo Mazzolini[1]
Laboratorio de Terapia Génica, Facultad de Ciencias Biomédicas y Hospital Universitario Austral, Universidad Austral[1] CIMA, Universidad de Navarra[2]

SPARC es una glicoproteína matricelular involucrada en diversos procesos biológicos, entre los que se encuentra la fibrogénesis hepática. Hemos demostrado previamente en un modelo de fibrosis hepatica avanzada inducido por tioacetamida (TAA) que la ausencia de SPARC tiene un rol protector en la generación de fibrosis. Con el fin de estudiar los mecanismos involucrados en la protección de la fibrosis en ausencia de SPARC se realizó un análisis de los cambios de la expresión génica utilizando la plataforma de microarrays y de la expresión de proteínas utilizando 2D-DIGE sobre muestras hepáticas provenientes de ratones $SPARC^{+/+}$ y $SPARC^{-/-}$ tratados 10 semanas con TAA. Para confirmar los resultados obtenidos se realizaron ensayos de immunohistoquímica y qPCR para PCNA a 24 horas de tratamiento con TAA. Asimismo, se obtuvieron cultivos primarios de hepatocitos provenientes de ratones $SPARC^{+/+}$ y $SPARC^{-/-}$ y se evaluaron los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) utilizando dichlorofluoresceina (DCFH) tanto en citometria como así también con microscopia de fluorescencia a las 3 horas de la administración de TAA. El análisis proteómico mostro un aumento de proteínas involucradas con la detoxificación de especies reactivas del oxígeno (catalasa, peroxirredoxina-1 y glutation-S-Transferasa P1 y Mu1) en los ratones $SPARC^{-/-}$ tratados con TAA, mientras que el estudio genómico mostro que a las 10 semanas luego de tratamiento con TAA los ratones $SPARC^{-/-}$ presentaban un incremento en la expresión de genes relacionados con la reparación de ADN y la proliferación celular. Los ratones $SPARC^{-/-}$ mostraron un incremento significativo de PCNA a las 24 horas tanto en los niveles de expresión génica como de proteínas. Asimismo, los niveles de especies reactivas del oxigeno fueron menores en los hepatocitos provenientes de ratones $SPARC^{-/-}$ que en los $SPARC^{+/+}$ tratados con TAA. La ausencia de SPARC tiene un rol protector ante un estímulo fibrogénico como la TAA. Esta protección podría deberse, al menos en parte, a una mayor capacidad proliferativa de los hepatocitos y a una menor inducción de especies reactivas del oxígeno.

426 (362) EFECTO DE LA HIPERTENSIÓN PORTAL(HP) NO CIRRÓTICA EN LA MOTILIDAD, EXPRESIÓN DE MARCADORES DE UNIONES INTERCELULARES Y TRASPORTADORESABCAPICALESENINTESTINO

Lisandro Orbea[12]; Susana Gorzalczany[3]; . Paul Fisch[4]; Juan C Perazzo[2]; Carolina I Ghanem[1]
ININFA[1] CPEA-UBA[2] Cat de Farmacología-FFYB.[3] Inst of pathology.U of Freiburg.[4]

La cirrosis hepática origina el 80% de los casos de HP. En la cirrosis, la motilidad, permeabilidad e inmunidad local intestinal se ven alteradas. Esto predispone a la génesis de sus complicaciones, como son la encefalopatía hepática e infecciones. El 20% de los casos restantes de HP sufren las mismas complicaciones, sin embargo nunca se estudió el efecto que la congestión sanguínea per se produce sobre en dichos parámetros. El objetivo del presente estudio, es evaluar si la mera obstrucción del lecho portal, en ausencia de inflamación, produce modificaciones en la motilidad y permeabilidad intestinal. Método: Se utilizaron Ratas Wistar Macho, (220-250g). Grupo HP, sometido a la estenosis parcial y calibrada de Vena Porta (aguja 20G) durante 14 días. Grupo SH, sometido a cirugía simulada. Luego se evaluó en ambas poblaciones la respuesta contractil a ClK (80 mM) y dosis crecientes de Acetilcolina (Ach) (10^{-9} a 10^{-6}M). Se evaluó con la expresión de marcadores de uniones enterocíticas (ZO-1 y β-catenina) mediante WB e IHQ. También se estudió el transporte específico evaluando la expresión de los principales transportadores ABC de localización apical (P-gp

y Mrp2) por WB e IHQ. *P<0.05 vs SHAM. Resultados: La respuesta contráctil a ClK disminuyó un 33%* y un 59*; 48*y 46%*; luego de estímulo con Ach a 10^{-9};10^{-8}; 10^{-7}M, respectivamente en HP. La HP disminuyó la expresión de -catenina (SH: 110.5 ± 20.68 vs HP: 46.55 ± 11.11*) y ZO-1 (SH: 126.9 ± 3.37 vs HP: 62.46 ± 9.62*). Respecto a los trasportadores ABC apicales, en íleon la expresión de P-gp se observa aumentada (SH: 103.1 ± 5.529 vs HP: 199.6 ± 31.39*), mientras que Mrp-2 disminuye (SH: 100.0 ± 15.34 vs HP: 46.57 ± 9.212*). Conclusión: Se demuestra que la congestión per se generada por la abrupta estenosis parcial de la vena Porta, altera la respuesta contráctil y ciertos parámetros de permeabilidad intestinal pudiendo contribuir de esta forma al desarrollo de la complicaciones mencionadas.

427 (464) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEVMP1 Y AUTOFAGIA ANTE LA HIPOXIA Y EL TRATAMIENTO QUIMIOTERAPÉUTICO EN CÉLULAS TUMORALES

Cintia Betiana Catrinacio[1]; Matias E. Rodríguez[2]; Felipe J. Renna[1]; Viviana A. Rivarola[2]; María Inés Vaccaro[1]; Alejandro J. Ropolo[1]
IBIMOL, Subsede Fisiopatologia, FFyB - UBA/CONICET[1] Departamento de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Unive[2]

La autofagia es un proceso de degradación de constituyentes celulares citoplasmáticos que se ha demostrado posee un rol pro-tumorigénico. La célula tumoral desarrolla autofagia como mecanismo de adaptación a condiciones estresantes como la hipoxia y el tratamiento. VMP1 es una proteína de membrana necesaria para la formación del autofagosoma, y en la célula tumoral pancreática la vía de señalización PI3K-AKT1 activa el complejo GLI3-p300 que se une al promotor de VMP1 regulando su actividad. En este trabajo, el objetivo es caracterizar la regulación de la expresión de VMP1 en células tumorales ante la quimioterapia y en condiciones de hipoxia. Como modelos de estudio usamos células tumorales pancreáticas resistentes al tratamiento con gemcitabina y condiciones de hipoxia química por $CoCl_2$ en células tumorales de colon. Evaluamos la regulación del promotor del gen vmp1 mediante ensayos de luciferasa e inmunoprecipitación de cromatina. Identificamos al factor de transcripción E2F1 como un efector de la autofagia inducida por gemcitabina y al factor Hif-1alfa como inductor de autofagia mediada por VMP1 en condiciones de hipoxia. E2F1 se une al promotor del gen vmp1 en las células tumorales pancreáticas PANC-1 y MIAPaCa-2 regulando la actividad del promotor y la expresión de VMP1 ante el tratamiento con gemcitabina. Asimismo, Hif-1alfa se une al promotor de vmp1 en células tumorales de colon sometida a hipoxia química. Además, identificamos a la histona acetiltransferasa p300 como un modulador de la actividad de este promotor. P300 controla la actividad del promotor y potencia la activación de la expresión de VMP1 en células tumorales. En conjunto, nuestros resultados proporcionan evidencia sobre los mecanismos de regulación a nivel transcripcional de la autofagia e integran este proceso con la compleja red de eventos puestos en juego por la célula tumoral implicados en la resistencia tumoral al tratamiento.

428 (481) MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICADEMACRÓFAGOS HEPÁTICOS TRAS EL TRASPLANTEDE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES SOBRE-EXPRESANDO EL FACTOR DE CRECIMIENTO SÍMILINSULINA-I EN LA FIBROSIS HEPÁTICA

Esteban Fiore[1]; Estanislao Peixoto[1]; Maríana Malvicini[1]; Juan Bayo[1]; Catalina Atorrasagasti[1]; Marcelo Rodríguez[1]; Romina Sierra[2]; Sofia Gómez Bustillo[1]; Maríana Garcia[1]; Jorge B. Aquino[2]; Guillermo Mazzolini[1]
Lab. Terapia Génica, Fac. de Cs. Biomédicas, Universidad Austral[1] Lab. de Biología del Desarrollo y Medicina Regenerativa, Fac. de Cs. Biomédicas, Universidad Austral[2]

Los macrófagos (Mø) hepáticos cumplen un rol importante tanto en la fibrogénesis como en la reversión de la fibrosis hepática. La capacidad de las células mesenquimales estromales (MSC) de migrar selectivamente hacia sitios de injuria permitiría utilizarlas como vehículo de genes terapéuticos. Anteriormente demostramos que la aplicación sistémica de MSC sobre-expresando el factor de crecimiento símil insulina-1, mediante un vector adenoviral (AdIGF-I-MSC) tiene un efecto inhibidor sobre la fibrosis hepática mediado por una reducción en la activación de las células estrelladas hepáticas y el estímulo de la regeneración hepatocitaria. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto sobre los Mø hepáticos tras la administración de AdIGF-I-MSC en un modelo de fibrosis hepática murino generado mediante aplicación crónica de tioacetamida. Las MSC provenientes de médula ósea de ratones Balb/C fueron infectadas con AdIGF-1-MSCs o un adenovirus control que expresa GFP (*Green Fluorescent Protein*; AdGFP-MSC). Tras 6 semanas de inducción de la fibrosis, se aplicó el tratamiento experimental (AdIGF-I-MSC o AdGFP-MSC) o vehículo y 24 horas después se aislaron los Mø hepáticos para el análisis de su fenotipo, mediante qPCR y ELISA. Asimismo, se tomaron muestras de hígado para estudios de inmunofluorescencia y se evaluó el efecto del sobrenadante de las AdIGF-I-MSC sobre Mø peritoneales. La aplicación de AdIGF-I-MSC no resultó en cambios significativos en el número total de Mø hepáticos, aunque indujo un mayor reclutamiento de los mismos en el lobulillo hepático a expensas de su presencia en los septos de fibrosis. Asimismo, se redujo la expresión de iNOS, TGF-b, TNF-a, IL1b, IL6 e IL12 mientras que aumentó la expresión de Arginasa-1 e IL10 en los Mø hepáticos aislados a partir de animales tratados con AdIGF-I-MSC. Además, la incubación de Mø peritoneales con el sobrenadante de AdIGF-I-MSC incrementó su producción de IL10 y consistentemente redujo sus niveles de producción de IL6. Nuestros resultados sugieren que el efecto de la terapia génica y celular con AdIGF-I-MSC sobre la fibrósis hepática se relaciona, en parte, con la modulación de los Mø hepáticos hacia un perfil de tipo antifibrótico/ regenerativo.

429 (567) LA MUTACIÓN DE LA SER908 EN EL TRANSPORTADOR CANALICULAR MRP2 PREVIENE SU ENDOCITOSIS INDUCIDA POR LA ACTIVACIÓN DE PROTEÍN QUINASAS C CLÁSICAS (CPKCS). IMPLICANCIA EN COLESTASIS POR ESTRÓGENOS

Guillermo Nicolás Tocchetti[1]; Agostina Arias[1]; Paiboon Jungsuwadee[2]; Juan Pablo Rigalli[1]; Silvina Stella Maris Villanueva[1]; María Laura Ruiz[1]; Claudia Elena Banchio[3]; Mary Vore[2]; Aldo Domingo Mottino[1]
IFISE[1] Graduate Center For Toxicology (University of Kentucky)[2] IBR[3]

MRP2 contribuye a la formación de la bilis al secretar glutatión y sus derivados al canalículo biliar. La activación de cPKCs es en parte responsable de la colestasis generada por derivados de estrógenos como el 17-glucurónido de estradiol (E17G). Hemos demostrado en ratas y en la línea celular hepática de origen humano HepG2 que el mecanismo involucra endocitosis de MRP2 con consecuente pérdida de actividad. En este trabajo evaluamos si la endocitosis de MRP2 puede asociarse a un aumento en el grado de fosforilación del transportador debido a la activación de cPKCs. Para ello, se incubaron células HepG2 con timeleatoxina (TTX, 100 nM, 30 min), un activador selectivo de cPKCs, resultando en incremento de fosforilación de residuos de serinas en MRP2, sustratos de cPKCs (inmunoprecipitación seguida de inmunoblot). Mediante un analisis *in silico* identificamos a la Ser^{908}, ubicada en la región citosólica que conecta dos dominios transmembrana contiguos de MRP2 (región *linker*), como posible blanco de cPKCs. Sobreexpresamos GFP-MRP2 salvaje o una variante en la que se reemplazó la Ser^{908} por un residuo de Ala (A908SGFP-MRP2), y evaluamos el efecto de TTX sobre el contenido de GFP-MRP2 en membrana plasmática (MP) vs intracelular (MI) por inmunoblot. GFP-MRP2 salvaje disminuyó en MP (-74%) y aumentó en MI (+113%) en respuesta a TTX (n=4; p<0.05), mientras que la endocitosis se previno totalmente al sustituir la Ser por Ala. El transporte de dinitrofenil-glutation (sustrato modelo de MRP2) fue disminuido por TTX en células que expresan la forma salvaje (-23%; n=6; p<0.05) pero no en las que expresan la forma mutada de MRP2. Un comportamiento similar de la forma salvaje y mutada fue observado al tratar las

células con E17G (200 µM, 30 min). Concluimos que la Ser^{908} resulta clave en la afectación de la localización canalicular de MRP2 en condiciones de activación de cPKCs, representando un posible mecanismo para explicar su pérdida de actividad en la colestasis por estrógenos.

CARDIOVASCULAR 3

430 (233) ESTUDIO DE FRECUENCIA GENOTIPICA DE SODMNALA9VAL,MARCADORES DE INFLAMACION Y ESTRÉSOXIDATIVO EN CHAGAS

Julia Marina Caffaratti[1]; Susana Lioi[1]; Gabriela Gerrard[1]; Romina Diviani[1]; María Jose Ceruti[1]; Juan Beloscar[2]; Mabel D'Arrigo[1]
Area Química Analitica Clinica Fbioyf UNR[1] Carrera de Cardiología. FCM. UNR[2]

Introducción: En la Miocardiopatía Chagásica Crónica (MCC), la inflamación progresiva podría modificar el estado antioxidante celular. El curso de la enfermedad dependería de la carga y cepa parasitaria, factores genéticos y estado inmunológico del hospedero entre otros. OBJETIVOS: En este trabajo se propuso realizar un estudio descriptivo de frecuencia genotipica (FG) de superóxido dismutasa dependiente de Mn (SODMnAla9Val) y marcadores de estrés oxidativo, como actividad enzimática de superoxido dismutasa (SOD), peroxidación lipídica a través el ensayo de Sustancias Reactivas del Acido Tiobarbitúrico (MDA/TBARS) y factor de necrosis tumoral alfa (TNFalfa) como marcador de inflamación. Material y Métodos: Se analizaron muestras de sangre de individuos chagásicos sin MCC (ECsinMCC: 40), chagásicos con MCC (MCC: 45) y controles (CN: 60), se les realizó examen cardiovascular, electrocardiograma, radiografía de tórax y exámenes complementarios. Se analizaron SOD y MDA/TBARs por métodos espectrofotométricos (Kits Ransel Labs), TN-Falfa ELISA (BD). La caracterización molecular fue realizada por PCR-RFLP. Resultados: Los resultados se muestran como Media (DE): SOD(USOD/gHb): MCC 3500±750, ECsinMCC 2610±190, CN 890±310; MDA/TBARS(nmol/ml): MCC 4.24±1.52, ECsinMCC 3.36±1.20, CN 2.33±0.60. TNFalfa (pg/ml): CN 7.7±2.4, MCC 33.3±7.2, ECsinMCC 26.1±6.8. Para el estudio estadístico se realizó análisis de variancia a un criterio de clasificación para cada enzima y se aplicó Kruskal Wallis. El nivel de significancia se estableció en p <0,05, Los resultados muestran para SOD, MDA/TBARS y FNTalfa diferencias significativas (p< 0.01) entre MCC, ECsinMCC y CN. Para comparar las FG en los grupos estudiados, se realizó el ensayo de hipótesis de una proporción bajo teoría normal con un intervalo de confianza del 95% (IC 95%). Las FG en los grupos estudiados se compararon con la Test exacto de Fisher. Los resultados se muestran en la tabla I, en la cual se evidencia que existen diferencias significativas entre MCC y los demás grupos estudiados en Val-Val de SODMn (p= 0.00067, pc = 0.00134).

Tabla I. FG de Mn (SODMnAla9Val)

FG SODMn (IC 95 %)	ECsinMCC	MCC	CN
Ala-Ala	0.36 (0.089-0.631)	0.33 (0.10-0.48)	0.85 (0.259-1.021)
Ala-Val	0.46 (0.178-0.742)	0.30 (0.10-0.50)	0.15 (0.087-0.383)
Val-Val	0.18 (0.000-0.397)	0.37 (0.14-0.56)	0.00 (0.00-0.00)

Discusión: Es conocido que la actividad de MnSOD estaría más afectada por la variante Val de la Mn-SOD. En la MCC se observa aumento de FG de Val-Val, de actividad de biomarcadores de estrés oxidativo y de inflamación en MCC. Deberían realizarse nuevas investigaciones con mayor cantidad de pacientes para aclarar estos aspectos fisiopatológicos en la MCC.

431 (247) PARTICIPACIÓN DE LA PROTEINA KINASA B (AKT)EN LA TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL (PTPM) EN CORAZONES TRATADOS CON ROSUVASTATINA (R) SUJETOS A ISQUEMIA-REPERFUSION (I-RP)

Debora Velez; Mariángeles Barreda Frank; Romina Hermann; Victoria Mestre Cordero; Enrique Savino; Alicia Varela; María Gabriela Marina Prendes
Cátedra de Fisiología. FFyB, UBA. IQUIMEFA-CONICET

Con anterioridad hemos demostrado los efectos cardioprotectores de la R en corazones de rata sometidos a I-RP. Orientados a investigar la causa de estos efectos beneficiosos, nos propusimos estudiar la sensibilidad a la apertura PTPM frente a concentraciones crecientes de Ca^{2+}, y a establecer la posible participación de la AKT en estos eventos utilizando un inhibidor de la vía IP3K/AKT, wortmanina (W), por medio de Western Blot. Se emplearon corazones perfundidos Langendorff provenientes de ratas hembras Wistar (250–300 g) alimentadas *ad libitum*. Los mismos fueron sometidos a 25 min de isquemia (I)-60 min de reperfusión (RP). La R (3µM) se administro en el medio de perfusión 10 min antes de la I global total, la W (100nM) se suministró 5 min antes de la R y se mantuvo durante la isquemia. Las mitocondrias fueron aisladas al finalizar la RP sostenida y la apertura del PTPM se evaluó midiendo el descenso de la absorbancia (Abs) de la suspensión de mitocondrias a una longitud de onda de 540 nm. Se empleó ciclosporina A, inhibidor de la apertura del PTPM, para comprobar que los cambios en la Abs son debido a la apertura del mismo. Dicho agente inhibió en todos los grupos el descenso de la Abs en respuesta a la máxima concentración de Ca^{2+} empleada. La estadística se hizo con ANOVA (n=8). Resultados (expresados como% de caída de la Abs inicial a 540 nm):

	100 uM Ca2+	200 uM Ca2+	300 uM Ca2+	400 uM Ca2+	500 uM Ca2+
C	1,56±0,31	2,50±0,34*	2,25±0,30	1,93±0,27	2,36±0,21
R	0,48±0,18	0,75±0,15	1,14±0,20*	0,53±0,22	0,85±0,12
C+W	1,53±0,33	2,85±0,22*	2,50±0,23	2,25±0,29	2,20±0,26
R+W	1,67±0,36	2,43±0,28*	2,83±0,60	2,0±0,28	2,20±0,27

*p<0.05 vs% de caída de Abs en respuesta a todas las concentraciones menores de Ca^{2+} en el mismo grupo. La relación AKT-P/AKT-T fue mayor en el grupo R (p<0.05 vs C, C+W, R+W). La R demostró retrasar la apertura del PTPM, el empleo de W anuló las diferencias entre los grupos experimentales. Estos eventos podrían estar relacionados con la activación de la vía IP3K/AKT.

432 (256) LA TRH INDUCE LA EXPRESIÓN DE TGF Y COLÁGENOSI Y III EN LA LÍNEA CELULAR DE FIBROBLASTOSNIH 3T3: POSIBLE MEDIADORA DEL EFECTO FIBRÓTICODE AII

Ludmila Peres Diaz; Maia Aisicovich; María S Landa; Maríano L Schuman; Silvia I Garca
Laboratorio de Cardiologia Molecular, Instituto de Investigacioneas Médicas A. Lanari, UBA; UE IDIM, CONICET

Con experimentos "in vivo" demostramos que TRH cardíaca (TRHc) participa de los procesos desencadenantes de la hipertrofia cardiaca como hipertrofia, apoptosis y marcadamente en la fibrosis (Schuman y col 2011;2014). Hipotetizamos que la TRH debía actuar directamente sobre los fibroblastos cardíacos. Estas células poseen receptores para el tripeptido y son responsables de la fibrosis a través de la expresión de colágenos y la consecuente expansión de la MEC. Como aproximación utilizamos la línea celular de fibroblastos de ratón NIH3T3. Luego de 24 hs sin suero, el cultivo se estimuló con TRH (1 y 10 uM) durante 24 y 48 h, tiempo en los cuales un grupo de placas (n=8) se levantaron para extraer el RNA y cuantificar genes (TGF, col I y III, MMP 9y3) por PCR en tiempo real (syber green como fluoróforo intercalante). En otro grupo de placas (n=4) se cuantificaron las proteínas por inmunofluorescencia. También evaluamos el tamaño celular en las distintas condiciones. Observamos un aumento significativo de la expresión de TGF en ambas concentraciones de TRH a las 24 h (P<0.02) que se vio reflejado en una aumento de la proteína (p<0.03).En igual sentido colágeno I y III mostraron una aumento significativo (p< 0.01) en mRNA y proteína que concuerda con los resultados de TGF. Así también observamos un aumento (p< 0.02) del área celular de los fibroblastos estimulados con TRH a ambos tiempos. Decidimos estudiar si TRH es mediador del

efecto fibrótico de AII que se sabe esta mediado principalmente por TGF. Estimulamos los cultivos por 24h con AII 1uM con y sin bloqueo previo de TRH (lipofectamina+siRNA) y observamos que AII induce el aumento de TRH ($p<0.04$) y que su bloqueo atenúa el marcado aumento de TGF y de la expresión de colágenos inducido por AII. Nuestros resultados muestran por primera vez que la TRH actúa sobre los fibroblastos estimulando la expansión de la MEC (TGF, colágenos, etc.) y que su presencia es requerida para el efecto fibrótico de la AII.

433 (322) EL ROL DE LA TIOREDOXINA 1 EN EL MECANISMO DE PROTECCIÓN DEL POSCONDICIONAMIENTO ISQUEMICO

Tamara Mazo[1]; Virginia Perez[1]; Anabella Gómez[1]; Timoteo Marchini[2]; Verónica Casanova[3]; Pablo Evelson[2]; Verónica D´annunzio[1]; Ricardo J Gelpi[1]
INFICA. Departamento de Patología. Facultad e Medicina. UBA[1] IBIMOL[2] Bioterio Central. Facultad de Ciencias Veterinarias. UBA[3]

La Tioredoxina-1 (Trx1) es un antioxidante que mantiene el estado redox celular y disminuye el tamaño de infarto frente a la injuria por isquemia/reperfusión (I/R), sin embargo no hay estudios que evalúen el rol de la Trx1 en el poscondicionamiento isquémico (PI). Por ello, el objetivo fue estudiar si en el mecanismo de protección del PI participa la Trx-1. Se utilizaron corazones de ratones no transgénicos (NTG), ratones transgénicos que sobreexpresan Trx1, y ratones con Trx1 mutada en su sitio activo (DN, con actividad casi nula). Los corazones de los ratones fueron sometidos a 30min de I y 120min de R (técnica de Langendorff) (grupo I/R). En el grupo PI, luego de la I se realizaron 6 ciclos de R/I (15seg y 10seg, respectivamente). Se midió la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI), la presión diastólica final VI (PDFVI) y el tamaño de infarto (Técnica de trifenil tetrazolium); además se evaluó la expresión de Trx1 (Western Blot). El tamaño de infarto en el grupo NTG-PI disminuyó con respecto a los NTG-I/R (52.3±3.1% vs 40.1±1.9, $p<0.05$), pero esta protección se abolió en los DN-PI (54.3±3.9% vs 47.7±1.1). El grupo Trx1-I/R logro mimetizar la protección del PI con un valor de 31.1±2.7%. La PDVI y la PDFVI no mostraron cambios significativos entre los grupos durante la reperfusión. La expresión de Trx1 aumentó en los grupos Trx1 y DN, comparados con los NTG en situación basal (Trx1:2.6±0.1UA, DN:2.3±0.06: $p<0.05$ vs. NTG-B:1.0±0) como era de esperar. Luego de la I/R, la expresión de Trx1 disminuyo en los NTG (NTG: 0.32±0.09 UA), sin embargo el PI preservo la expresión de Trx1 (0.65±0.08 UA $p<0.05$ vs. NTG I/R). Nuestros resultados sugieren que la Trx-1 participa, al menos en parte, de la protección conferida por el PI frente al tamaño de infarto, dado que la expresión de esta proteína disminuye luego de la injuria por I/R y se restaura parcialmente tras la realización del protocolo de PI.

434 (388) INFLIXIMAB PREVIENE LAS ALTERACIONES DE LAFUNCIÓN CARDÍACA PRODUCTO DE UNA EXPOSICIÓNAGUDA A PARTÍCULAS DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL:ROL DEL CALCIO Y DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL

Lourdes Cáceres[1]; Timoteo Marchini[1]; Verónica D'Annunzio[1]; Mariela L Paz[2]; Maríana Garcés[1]; Virginia Perez[1]; Deborah Tasat[3]; Virginia Vanasco[1]; Natalia Magnani[1]; Daniel González Maglio[2]; Ricardo J Gelpi[1]; Silvia Álvarez[1]; Pablo Evelson[1]
Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL)[1] Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU) - UBA-CONICET)[2] CESyMA, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de General San Martín[3]

La exposición a material particulado (MP) se encuentra asociada a incrementos en la mortalidad cardiovascular, donde una respuesta inflamatoria sistémica ha sido señalada como uno de los principales responsables. Se ha mostrado que el tratamiento previo con Infliximab previene tanto la disminución del consumo de O2 en corazón, como la caída de la reserva contráctil y diastólica cardíaca en ratones expuestos a MP derivado de la combustión del petróleo (ROFA). El objetivo de este trabajo fue estudiar los mecanismos subyacentes a este efecto, en ratones Swiss hembras (25 g) expuestos a ROFA (1 mg/kg) y tratados previamente con Infliximab (10 mg/kg). Luego de 3 h, se realizó un perfil plasmático de citoquinas y se determinó el consumo de O2 en mitocondrias aisladas de corazón. Además, se evaluó la reserva contráctil y diastólica cardíaca según la técnica de Langendorff, como la PDVI y el t50 en condiciones basales y luego de un estímulo β-adrenérgico con isoproterenol (ISO), respectivamente. La exposición a ROFA indujo aumentos en los niveles de TNF-α e IL-6, que fueron revertidos mediante el tratamiento con Infliximab. Se observó una disminución del 31% en la respiración activa mitocondrial (control estado 3: 91 ± 8 ng at O/min mg proteína, $p<0,05$) y en el control respiratorio en los ratones expuestos a ROFA, lo cual fue prevenido mediante el tratamiento con Infliximab. En la perfusión del corazón aislado utilizando una solución reguladora Krebs con bajo calcio, se encontró una respuesta similar en los corazones de los ratones expuestos a ROFA con respecto al control. En ambos casos, se observó un aumento de la PDVI en respuesta al ISO (ΔPDVI control: 65 ± 13%, $p<0,001$), y una disminución del t50 (Δt50 control: -22 ± 2%, $p<0,001$). Estos resultados sugieren que el TNF-α se encuentra involucrado en los efectos adversos a nivel cardiovascular producto de la exposición al MP, y que los mismos estarían mediados por el calcio y alteraciones de la función mitocondrial.

435 (490) MECANISMOS DE PROTECCIÓN DE LA ESTIMULACIÓN VAGAL PRE-ISQUÉMICA Y POST-ISQUÉMICA EN LA INJURIA POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN MIOCÁRDICA EN RATONES

Jazmín Kelly[1]; Bruno Buchholz[1]; Marina Munoz[2]; Eduardo Bernatene[1]; Nahuel Mendez Diodati[1]; Daniel Gonzalez Maglio[3]; Fernando P Dominici[2]; Ricardo J Gelpi[1]
IBIMOL-Subsede Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, UBA.[1] IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.[2] IDEHU, Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.[3]

Se conocen efectos protectores de la estimulación vagal (EV) prolongada en la cardiopatía isquémica, siendo poco conocidos los efectos de la EV breve antes de la isquemia o en la reperfusión. El objetivo fue estudiar los efectos y mecanismos de protección de la EV aplicada selectivamente antes de la isquemia (EVp) y en el inicio de la reperfusión (EVr). En ratones FVB machos se realizó una isquemia miocárdica regional de 30 min y 2 horas de reperfusión sin EV (I/R, n=8); con EVp por 10 min (n=8); con EVp y bloqueo muscarínico con atropina (Atr) (n=8); con EVp y bloqueo nicotínico α7 con metilicaconitina (MLA) (n=8). También, se estudiaron los efectos de la EVr (n=9); con Atr (n=8); con MLA (n=8); y con el bloqueante de la JAK2, AG490 (n=6). Para evaluar la participación de la vía colinérgica antiinflamatoria del bazo en la protección, se realizó EVr con sección vagal abdominal dorsal (n=7) y esplenectomía (Esp) (n=7). Por cateterismo se midió la función ventricular izquierda. Se midió el área de riesgo con azul de Evans y el área de infarto con TTC. A los 5 min de EV la FC disminuyó un 10% respecto al basal tanto en el grupo EVp como EVr; siendo bloqueados estos efectos con Atr. Se observó un deterioro de la función ventricular con la isquemia, sin diferencias entre los grupos. Tanto la EVp (44±3%) como la EVr (40±2%) redujeron el tamaño del infarto respecto al grupo I/R (59±3%) ($p<0,05$). La protección de la EVp fue bloqueada por la Atr (56±2%) ($p<0,05$), pero no por el MLA (44±3%). En cambio, la protección de la EVr no fue bloqueada por la Atr (39±2%), pero si por el MLA (60±3%) ($p<0,05$) y por el AG490 (53±2%) ($p<0,05$). Además, ni la denervación del bazo, ni la Esp revirtieron la protección de la EVr (42±4% y 42±3%, respectivamente). En conclusión, la EVp reduce el tamaño del infarto por vía muscarínica. En cambio, la EVr protege por activación nicotínica de la vía de la JAK2, pero podría ser independiente de la vía colinérgica antiinflamatoria sistémica.

436 (536) CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE LA ERITROPOYETINA SOBRE LA RESPUESTA HEMODINÁMICA

Y FUNCIONALIDAD CARDÍACA EN LA HEMORRAGIA AGUDA SEGÚN AVANZA LA EDAD

María Bernardita Puchulu; Noelia Arreche; Rocio Altalef; Jasmin Silva Cousido; Natalia Ogonowski; Francisco Perosi; Gustavo Cernadas; Viviana Mesch; Martin Donato; Andrea Fellet; Ana María Balaszczuk
Fac. de Farmacia Y Bioquímica

La eritropoyetina (EPO) no solo posee efectos benéficos en el tratamiento de la anemia crónica, sino que también se han descripto funciones cardioprotectoras. Objetivo: estudiar los efectos del tratamiento previo con EPO sobre la respuesta hemodinámica, funcionalidad cardíaca en ratas Sprague-Dawley machos 2 (joven:J) y 12 (adulto:A) meses de edad sujetas a hemorragia 20% de la volemia anestesiadas. Métodos: Grupo C: controles; Grupo H: sometidas a una hemorragia del 20% de la volemia, Grupo EPO: pretratadas con EPO (1000 mUI/Kg peso/3 días); Grupo EPO+H: pretratadas con EPO, sometidas a hemorragia del 20% volemia. Se determinaron EPO plasmática; presión arterial media (PAM), frecuencia cardíaca (FC); parámetros ecocardiograficos. Resultados: EPO plasma (mUI/ml): grupo C <0,71±0,11vs grupo EPO 21,97±9,79*. El pretratamiento con EPO no modificó los valores basales de PAM y FC. La hemorragia provocó una disminución de la PAM en el grupo H y EPO H joven a los 5 min (30±2 mmHg,*p<0.01vsvalores basales; 51±5 mmHg, *p<0.01vsvalores basales respectivamente). En el grupo EPO se observó un incremento de la PAM alcanzando a partir de los 120 min valores similares a los basales (2 meses 69±4 mmHg; 12 meses 78±3 mmHg, p=NS vsvalores basales). La hemorragia indujo, un incremento de la FC en la fase tardía post-hipovolemia (Grupo HJ basal FC=335±6; FC 120 min=416±6*, *p<0.01vsvalores basales). El mismo efecto fue observado en el grupo EPO+HJ; la taquicardia post-hemorrágica fue menor (Grupo EPO+HJ basal FC=349±6; FC 120 min=380±6*#, *p<0.01 vs valores basales; #p<0.01 vs Grupo HJ). Grupo adulto mostró el mismo patrón de cambios en la FC. Grupo HA basal 315±1vs120 min 410±2, *p<0.01vsvalores basales; EPO HA 280±9vs120min 338±12 *p<0.05). El tratamiento con EPO indujo un aumento de la fracción de acortamiento (37±4vs45±2 *p<0.05) en Grupo EPO+HA. Conclusión: la EPO luego de una hemorragia aguda ajusta los parámetros hemodinámicos y la función cardiaca según avanza la edad.

REPRODUCCIÓN 5

437 (34) CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DELEPTINA SOBRE LA MIGRACIÓN E INVASIÓN DE CÉLULASTROFOBLÁSTICAS HUMANAS.

Ayelen Rayen Toro[1]; Rocío Sampayo[2]; Antonio Pérez-Pérez[3];Vanina Fontana[3], Víctor Sánchez-Margalet[3]; Marina Simian[2]; Cecilia Varone[1]
IQUIBICEN-CONICET, FCEyN, UBA[1] Área de Investigaciones, Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", Buenos Aires, Argentina.[2] Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla, Sevilla, España.[3] Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA[3]

La leptina, proteína conocida por su capacidad de regular el balance energético del organismo, posee un rol importante durante el embarazo ya que está involucrada en la regulación del crecimiento placentario y en la tolerancia materno-fetal. La placenta humana produce leptina y demostramos que dicha hormona es capaz de aumentar la proliferación e inhibir la apoptosis de células trofoblásticas. Resultados previos de nuestro grupo indican que leptina promueve la migración e invasión de células trofoblásticas. En el presente trabajo nos planteamos como objetivo caracterizar los mecanismos involucrados en la acción de leptina sobre dichos procesos. Se utilizó como modelo experimental la línea citotrofoblástica humana de primer trimestre *Swan-71*. Se utilizaron concentraciones crecientes de leptina (50, 100 y 250 ng/ml) y/o inhibidores farmacológicos para las vías de señalización de MAPK (PD98059) y PI3K/Akt (LY294002) y de la actividad de MMPs (GM6001). Para estudiar si el efecto de leptina es reversible, se eliminó la leptina del medio de incubación durante 24h. Se llevaron a cabo experimentos de *q*RT-PCR y *Western blot* para el evaluar la expresión de distintas proteínas, zimografías para medir la actividad de MMPs y ensayos de cierre de herida para estudiar el proceso de migración celular. Se observó que leptina aumenta la expresión y la actividad de MMP-2. Leptina disminuye los niveles de expresión de E-cadherina y se demostró que es necesaria la actividad de MMPs para ejercer dicha acción. Los niveles de ß1 Integrina son aumentados por leptina, independientemente de la actividad de MMPs. Se halló que el efecto de leptina sobre E-cadherina es reversible y que su acción sobre ß1 Integrina se revierte sólo en presencia de 250 ng/ml de leptina. Por último, se evidenció que leptina promueve la migración celular involucrando la vía de MAPK. Podemos concluir que leptina promueve la migración e invasión trofoblástica, procesos críticos para la implantación embrionaria.

438 (100) EFECTO DE PROTEÍNA S100 A9, PRESENTE EN OVIDUCTO,SOBRE LA REACCIÓN ACROSÓMICA EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS

Estefanía Ma Massa; G. Prez; C Zumoffen; S Ghersevch
Univ. Nac. de Rosario - Fac. de Cs. Bioquímicas yFarmacéuticas Area Bioquímica Clínica

En trabajos previos hemos demostrado la presencia de la proteína S100 A9 en el oviducto humano y en sus secreciones, y que la misma puede unirse al espermatozoide humano. El objetivo del presente trabajo fue investigar si dicha proteína afectaba la reacción acrosómica (RA) en espermatozoides humanos. Se obtuvieron espermatozoides móviles por swim up de muestras de semen de donantes normozoospérmicos (n=8), evaluados según el criterio de la O.M.S. (2010) y el criterio estricto. Los espermatozoides se incubaron en condiciones de capacitación durante 6 h en presencia de S100 A9 recombinante humana (0, 0,1, 1,0 y 10,0 µg/ml) a 37ºC, pCO_2 5%. Al cabo de la incubación se indujo la RA con progesterona (20 µM). Los espermatozoides fueron fijados y la RA se detectó con la lectina *Pisum sativum* conjugada con isotiocianato de fluoresceína y los preparados se observaron en un microscopio de epifluorescencia. Se contaron al menos 200 células por tratamiento. Se determinó el% de espermatozoides reaccionados en ausencia del inductor de RA (RA basal) o en presencia del mismo (RA inducida). Se informó el% de población inducible (%PI: diferencia entre% de RA inducida y el% de RA basal dentro de cada tratamiento). Se evaluaron también la viabilidad y la motilidad espermática. El análisis estadístico se basó en el análisis de la variancia, considerando significativo un p<0,05. Los resultados se expresaron como media ± error estándar. Se encontró un aumento significativo del%PI en presencia de 0,1 µg/ml de S100 A9 respecto del control (23,8 ± 4,9% vs. 8,1 ± 1,1%, respectivamente, p<0,01). Las otras dosis de la proteína no afectaron significativamente al%PI. La presencia de S100 A9 no afectó ni la viabilidad ni la motilidad espermática, que fueron similares a las de los controles. La menor concentración ensayada de S100 A9 incrementó la RA inducida, sin afectar la RA basal. Dado que la proteína puede unirse a los espermatozoides, el efecto podría ser mediado por receptores.

439 (139) FIBRONECTINA ACTÚA COMO PROTEÍNA MODULADORA DE LA INTERACCIÓN ESPERMATOZOIDE OVIDUCTO EN BOVINOS

Claudia Elena Osycka-Salut[1]; Luciana Castellano[1]; Carlos Agustin Isidro Alonso[1]; Daiana Fornes[2]; Jimena Soledad Beltrame[3]; Alicia Jawerbaum[2]; Emilce Silvina Diaz[4]; Silvina Perez-Martinez[1]
Lab Biología de la Reproducción en Mamíferos - CEFYBO[1] Lab de Reproducción y Metabolismo - CEFYBO[2] Lab de Fisiología y Farmacología de la Reproducción - CEFYBO[3] Lab de Biología de la Reproducción - Universidad de Antofagasta - Chile[4]

El oviducto actúa como un reservorio de espermatozoides (ESP) los cuales se unen a las células epiteliales del mismo hasta que señales asociadas a la ovulación inducen su liberación

permitiendo la fecundación. El proceso de capacitación espermática es una causa de la liberación. La fibronectina (Fn) es una glicoproteína que se une a integrinas $\alpha5\beta1$. Recientemente demostramos que Fn induce la capacitación en ESP humanos. El objetivo fue caracterizar la expresión de Fn en el epitelio oviductal y evaluar su participación en la interacción ESP-oviducto en bovinos. Cuantificamos los niveles de Fn a lo largo del ciclo estral en células epiteliales del oviducto (CEO) y fluido oviductal bovinos mediante qPCR y por ELISA, siendo mayores los niveles de Fn en el estadio pre-ovulatorio ($p<0,05$). Estudios de inmunohistoquímicas indicaron que el epitelio oviductal expresa Fn y que el ESP bovino al receptor $\alpha5\beta1$. Se utilizaron cocultivos de ESP-CEO para evaluar la unión o la liberación de los ESP a las CEO. La preincubación de ESP con un anticuerpo anti-$\alpha5\beta1$ inhibió la unión de los mismos a las CEO ($p<0,05$). Por otro lado, la incubación de los cocultivos con Fn indujo la liberación de los ESP ($p<0,05$). Los ESP liberados con Fn presentaron un mayor porcentaje de ESP con motilidad progresiva y patrón capacitado respecto al control ($p<0,05$). Además, evaluamos distintos eventos asociados a la capacitación espermática en ESP incubados con Fn. La glicoproteína aumentó el número de ESP con patrón capacitado (por CTC e inducción de reacción acrosomal por LPC) e incrementó los niveles de óxido nítrico (citometría de flujo) y de proteínas fosforiladas en serina-treonina (WesternBlot) ($p<0,05$). Los resultados sugieren por primera vez la participación de Fn en la unión de los ESP al oviducto en bovinos. En el estadio preovulatorio, un incremento en los niveles de Fn oviductal induciría eventos asociados a la capacitación espermática promoviendo la liberación de los ESP del epitelio oviductal.

440 (241) CAPACIDAD FECUNDANTE ESPERMÁTICALUEGO DEL CONSUMO MURINO SEMICRÓNICO DEALCOHOL: EFECTOS EN LA CINÉTICA DE LA DESCONDENSACIÓN NUCLEAR DURANTE LA FERTILIZACIÓN IN-VITRO

Melisa Celeste Sanchez[1]; Vanina Andrea Fontana[14]; Cristian Sobarzo[2]; Juan Carlos Calvo[14]; Elisa Cebral[3]
IBYME[1] INBIOMED-UBA/CONICET, Fac Medicina-UBA[2] IFIBYNE-UBA/CONICET y DBBE, FCEN-UBA[3] Departamento de Química Biológica, FCEN-UBA[4]

El consumo de alcohol en el hombre produce disfunción testicular y elevado riesgo de infertilidad. Previamente, vimos que la ingesta crónica (30 días) del 10% de alcohol induce, en el ratón adulto, alto% de espermatozoides anormales con reducida capacidad fecundante, mientras que la ingesta semicrónica (15 días) del 15% de alcohol lleva a inhibición parcial de la meiosis y apoptosis testicular, y a incremento de espermatozoides anormales. Con el objeto de indagar la capacidad fecundante espermática luego de la ingesta semicrónica de alcohol, se analizó: 1) el grado de capacitación espermática:% de hiperactivación,% de reacción acrosomal inducida (test HOS-SPERMAC), 2) la tasa de descondensación inducida, 3) el% de fertilización in-itro (FIV), 4) la dinámica de descondensación nuclear post-FIV. Se trataron machos murinos CF-1 de 60 días de edad, con 15% de etanol en el agua de bebida, por 15 días (MT, vs machos controles, MC). Los MT presentaron reducido% de espermatozoides hiperactivados y reaccionados a los 120 minutos de capacitación, vs% de los MC ($p<0,05$). Sin embargo, la exposición a alcohol indujo un aumento significativo del% de espermatozoides descondensados a los 60 minutos post-inducción (GSH+Heparina) (48 ± 3% de MC, n=8 vs 57±4% de MT, n=10, $p<0,05$). Luego de 4 hs post-inseminación (T4), los MT tuvieron mayor% de fecundación (IICP + 2 PNs) respecto de los MC ($p<0,05$), siendo el% de espermatozoides descondensados en los oocitos activados-fecundados (II CP + PN femenino + descond.) mayor a las 2 y 3 h post-FIV en los MT vs el% de los MC ($p<0,05$). Estos resultados demuestran que la ingesta semicrónica moderada de alcohol inhibe parcialmente la capacitación espermática pero induce incremento de la cinética de la descondensación del espermatozoide en presencia de factores descondensantes y del oocito, lo que sugiere la desregulación de la dinámica de formación pronuclear y singamia en la cigota temprana.

441 (330) EL CANAL CFTR REGULA EVENTOS DEPENDIENTES DE HCO3- ASOCIADOS A LA CAPACITACIÓN EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS

LIS DEL C. PUGA MOLINA[1]; Paulina Torres Rodríguez[2]; Alberto Vicens Sánchez[2]; Nicolás A. Pinto[1]; Ana Romarowski[1]; Florenza A. La Spina[1]; Guillermina M. Luque.[1]; Claudia L. Teviño[2]; Alberto Darszon[2]; Pablo E. Visconti[3]; Maríano G. Buffone[1]
IBYME[1] IBT-UNAM[2] VASCI-UMASS[3]

El espermatozoide eyaculado de mamíferos no es capaz de fecundar al ovocito; debe adquirir la capacidad de fecundar durante la migración por el tracto reproductor femenino en un proceso complejo y estrictamente regulado denominado capacitación. En este contexto, se sabe que durante la capacitación del espermatozoide humano (spz) la entrada de bicarbonato (HCO_3^-) a la célula es esencial para: la fosforilación de sustratos de PKA (pPKA) y de tirosina-kinasas (pY), el incremento de pH intracelular (ΔpHi) y de la diferencia de potencial de membrana (ΔV), el desarrollo de movilidad hiperactivada (HA) y la reacción acrosomal (RA), entre otros eventos. Dado que el canal CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductace regulator) es un transportador de aniones, entre ellos Cl^- y HCO_3^-, planteamos como hipótesis que el CFTR media la entrada de HCO_3^- al spz siendo de vital importancia para el proceso de capacitación. En este trabajo, spz fueron incubados en condiciones capacitantes en presencia de inhibidores directos (inh-172 y GlyH-101) o indirectos (H-89 y medio capacitante carente de Cl-) de CFTR. En estas condiciones, los parámetros evaluados asociados a la capacitación (pPKA, pY, ΔpHi, ΔV, HA y RA) se vieron afectados. Contrariamente a lo observado en humanos, el uso de estos inhibidores no afectó la activación de la vía AMPc/PKA en espermatozoides de ratón. La estimulación farmacológica de PKA mediante el agregado de dbcAMP+IMBX logró revertir la inhibición sobre estos parámetros (pPKA, pY, ΔpHi, ΔV y HA). Estos resultados indican que el efecto observado se encuentra río arriba de la activación de PKA. Por lo tanto, proponemos que el CFTR media la entrada de HCO_3^- en el spz durante la capacitación siendo necesaria su actividad para el proceso de fecundación.

442 (355) USO DE ESFINGOLÍPIDOS COMO NUEVA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA EN LA PREVENCIÓN DEL SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA (OHSS

Maríana Di Pietro[1]; Natalia Pascuali[1]; Leopoldina Scotti[1]; Denise Mesquiatti[1]; Marta Tesone[12]; Dalhia Abramovich[1]; Fernanda Parborell[1]
IBYME[1] Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de Buenos Aires[2]

El OHSS es una complicación iatrogénica durante las técnicas de reproducción asistida. Los rasgos clínicos incluyen aumento en el tamaño de los ovarios, formación de quistes y aumento de permeabilidad vascular (ascitis). El S1P es un esfingolípido que promueve la integridad en la vasculatura. Previamente observamos que los niveles de S1P como de PDGF-B y –D (factor de crecimiento derivado de plaquetas) disminuían en fluido folicular de pacientes OHSS. Además, observamos que el S1P en un modelo OHSS en rata disminuía el porcentaje de c. lúteos y de quistes, y los niveles séricos de progesterona. El objetivo fue evaluar el efecto de S1P sobre la integridad vascular en un modelo animal de OHSS. Ratas prepúberes se inyectaron con eCG (50 IU/día) durante 4 días consecutivos y 24 hs después con hCG (25 IU) (OHSS). Al grupo OHSS+S1P se le inyectó S1P (5ul/ovario; 1mM) en el día de la inyección de hCG. El grupo control solo recibió eCG (25 UI) en el día 3 y hCG (10 UI) en el día 5. Luego de 48 hs de hCG los animales fueron sacrificados y se extrajeron los ovarios. En OHSS, se observó una disminución en la expresión proteica del PDGFRβ comparado al control. El S1P aumentó la expresión de dicho receptor, sin afectar los niveles de su ligando. En OHSS, los niveles de VE-caderina y N-caderina disminuyeron comparado al control. En cambio, el S1P los revirtió a niveles similares al control. El S1P no fue capaz de revertir el aumento de proliferación celular observada en OHSS. En OHSS, se observó

un aumento en la expresión proteica de 3-βHSD sin observarse cambios en la expresión de P450 scc comparado al control. El S1P no causó ningún cambio en estas enzimas esteroidogénicas. El S1P aumentó la expresión proteica de la forma clivada de PARP (marcador de apoptosis) comparado al grupo OHSS. Los resultados sugieren que en OHSS, la administración de S1P mejora la integridad en la vasculatura ovárica, disminuyendo la permeabilidad, y por ende, la severidad en dicho síndrome.

METABOLISMO Y NUTRICIÓN 4

444 (63) EFECTOS DE LA PROTEÍNA DE SOJA DIETARIA SOBRE MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTES Y ESTRÉS OXIDATIVO EN TEJIDO ADIPOSO EPIDIDIMAL DE RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA RICA EN SACAROSA

Paola Guadalupe Illesca[1]; Dante Alejandro Selenscig[1]; Yolanda Bolzón De Lombardo[12]; Mara Eugenia D Alessandro[12]
Departamento de Ciencias Biológicas. Lab. De Enfermedades relacionadas con la nutrición. FBCB.UNL.[1] Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. CONICET.[2]

Objetivo: investigar los efectos del reemplazo de caseína (origen animal) por proteína de soja dietaria (vegetal) sobre los mecanismos de defensa antioxidantes y estrés oxidativo en tejido adiposo (TA) epididimal de ratas dislipémicas e insulinoresistentes por la ingesta crónica de una dieta rica en sacarosa (DRS). Metodología: Ratas macho Wistar fueron alimentadas con DRS (62,5% sacarosa, 17% caseína) durante 4 meses. Luego la mitad de las ratas continuaron con DRS hasta el mes 8 de ingesta, mientras que la otra mitad recibió por 4 meses adicionales la DRS en la cual la caseína fue reemplazada por proteína de soja (PS). Otro grupo de ratas fue alimentado con dieta control (DC) (62,5% almidón, 17% caseína) durante 8 meses. Determinaciones: Plasma: triacilglicéridos (TAG), ácidos grasos no esterificados (AGNE), glucosa, insulina, ácido úrico, TNF-α . TA: actividad enzimática superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR), estado redox del glutatión. Estado prooxidante: actividad enzimática xantino oxidasa (XO) y TBARs. Se midió el tamaño de los adipocitos y su distribución. Resultados: Los elevados niveles plasmáticos de TAG, AGNE, ácido úrico y glucosa del grupo DRS fueron normalizados cuando la PS reemplazó a la caseína durante los últimos 4 meses de ingesta. La insulinemia fue similar en todos los grupos. El grupo DRS presenta mayor índice de adiposidad visceral e hipertrofia adipocitaria con deterioro de los mecanismos de defensa antioxidante celular enzimáticos y no enzimáticos y un marcado estado pro-oxidante y proinflamatorio. La PS disminuye el tamaño de los adipocitos sin alcanzar los valores del grupo DC, normaliza la actividad SOD y GR y mejora el estado redox del glutatión, pero continúa alterada CAT y GPx. Normaliza/mejora la actividad XO, TNF-α y TBARs. Conclusiones: la PS puede mejorar el estrés oxidativo e inflamación de las ratas DRS utilizadas ampliamente como un modelo de síndrome metabólico.

445 (194) INFLAMACIÓN EN CORTEZA RENAL DE RATA TRATADA CON LPS: EFECTO DE (-)-EPICATEQUINA (EC) DIETARIA

Laura Fischerman[1]; Paula D. Prince[1]; Patricia I Oteiza[2]; César G. Fraga[1]; Mónica Galleano[1]
IBIMOL[1] Departamento de Nutrición y de Toxicología Ambiental, Universidad de California, Davis, EE.UU.[2]

Los mecanismos de acción de los flavonoides dietarios sobre la salud no están aún dilucidados. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la (-)-epicatequina (EC) sobre las manifestaciones inflamatorias y funcionales en riñón de rata sometida al tratamiento con lipopolisacárido de pared bacteriana (LPS). Se alimentó por 4 d a ratas Sprague-Dawley con dieta control (C) o suplementada con 100 mg EC/kg de peso corporal/ día (E). En el cuarto día, los grupos se subdividieron en dos subgrupos, a los que se les administró i.p. solución fisiológica o LPS (4 mg/kg peso) (L) obteniendo 4 grupos experimentales: C; L; E; y LE. Transcurridas 6 h de la inyección de SF o LPS se procedió a la eutanasia. La administración de LPS en las ratas alimentadas con dieta control produjo alteraciones en la función renal evaluada en términos de contenido de creatinina y urea sérica (C= 0,45±0,04 y L= 0,58±0,03* mg creatinina/dl; C= 28±3 y L= 56 ± 7* mg urea/dl; *p<0,05). Para estudiar la activación de la vía inflamatoria mediada por NFκB, se determinaron los niveles de p65 por western blot en fracciones nucleares y citosólicas de corteza renal. La relación p65 nuclear/citosólica en la corteza renal de las ratas del grupo L fue un 86% mayor (p<0,04) que en las de C. La expresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) se incrementó en un 38% (p<0,05) en la corteza renal de las ratas del grupo L con respecto a las ratas C. En las ratas que recibieron la dieta suplementada con EC previo a la administración de LPS no hubo manifestaciones de alteraciones en la función renal ni en los parámetros asociados a la activación de NFκB y las proteínas cuya síntesis induce. Los resultados sugieren que la administración dietaria de EC se asoció a una atenuación en la respuesta inflamatoria en corteza renal que resultó en una protección de la función renal frente al tratamiento con LPS. UBACyT 20020120100177 y 20020130100760BA, PIP0612, PICT-2012-0765

446 (195) EFECTO CELULAR DEL FITOESTRÓGENO GENISTEÍNA EN EL SISTEMA ÓSEO Y VASCULAR

Sabrina Belén Cepeda; Marisa J. Sandoval; Mara B. Rauschemberger; Adrian E. Campelo; Pablo H. Cutini; Virginia L. Massheimer
INBIOSUR

Está descripto que un alto recambio óseo se asocia con una mayor mortalidad cardiovascular en el envejecimiento, proceso biológico vinculado al desarrollo tanto de osteoporosis como de enfermedad vascular. Los fitoestrógenos (FE) como la genisteína (Gen) son suplementos dietarios propuestos en la menopausia como protectores de la salud vascular y ósea. Objetivo: evaluar el efecto de Gen (10 nM) a nivel óseo y vascular. Se estudió la diferenciación osteoblástica y osteoclástica (OC), y la transdiferenciación de células musculares lisas vascular (CMLV) a linaje óseo (CMLV-OB), evento involucrado en la calcificación vascular (CaV). Sistemas experimentales murinos: línea celular osteoblástica (MC3T3); cultivos primarios de CMLV y, CMLV inducidas a transdiferenciación ósea en medio procalcificante (b-glicerolfostato 5 mM + Ca 4 mM, 25 días, medio A). El FE sobre osteoblastos MC3T3 produjo aumento de la expresión de la actividad de fosfatasa alcalina (FAL) (130% s/c, p<0.02), marcador de diferenciación ósea. La diferenciación a OC se estudió incubando monocitos de sangre entera sobre CMLV-OB. A 13 días de cultivo se detectaron cambios morfológicos compatibles con un fenotipo osteoclástico (tinción TRAPP) proceso regulado por el FE. El cambio de fenotipo contráctil de la CLMV a proliferante constituye el paso inicial de la CaV. Se observó un aumento en la proliferación celular de CMLV en medio A (10% s/c, p<0.01), evento revertido por el agregado de Gen (11% vs C, p<0.02). La validación del modelo de transdiferenciación fue presentado previamente. En este trabajo se demostró que el tratamiento de CMLV-OB con Gen disminuye FAL (33% s/c, p<0.01) y aumentó los niveles de Ca del medio extracelular (79±12.6 vs 63±18.1 mg/mg prot., p<0.05). Los resultados reflejarían que el FE ejercería acción favorable a nivel vascular, atenuando la lesión ateromatosa tanto en etapa temprana como tardía y regularía los procesos celulares involucrados en la remodelación ósea.

447 (204) INHIBICIÓN DEL POTENCIAL ADIPOGÉNICO INDUCIDO POR CONSUMO DE FRUCTOSA DURANTE LA GESTACIÓN

Ana Alzamendi[1]; Guillermina Zubiría[1]; Eduardo Spinedi[2]; Andrés Giovambattista[1]
IMBICE[1] CENEXA[2]

Resultados previos de nuestro grupo indican que el consumo de DRF durante la gestación induce en crías macho adultas, al-

teraciones metabólicas y de la función endócrina del tejido adiposo (TA). Evaluamos el impacto del consumo de DRF por la madre gestante sobre el potencial adipogénico en células de la fracción estroma vascular (FEV), aisladas de TA retroperitoneal (TARP) de la progenie macho adulta. Ratas S-D preñadas se dividieron en dos grupos: uno recibió agua y el otro DRF (fructosa 10% p/v en agua) para beber; y alimento *ad libitum* durante la gestación. Las madres lactantes y las crías (entre los días 21 y 60 de vida) (C y F) recibieron agua de bebida y alimento *ad libitum*. El día experimental disecamos y cuantificamos la masa de TARP, y aislamos las células de la FEV. Determinamos por qPCR la expresión de marcadores indicativos del potencial adipogénico. Los resultados muestran una disminución en la masa de TARP, aumento en el tamaño adipocitario y menor número celular ($p<0,05$ F vs. C). En conjunto con un aumento ($p<0,05$ F vs. C) en la expresión de leptina (lep) en TARP, lep circulante y la liberación de lep inducida por insulina (*in vitro*). En las células de la FEV incrementó ($p<0,05$ F vs. C) la expresión de Pref-1 y CD34. Dado que CD34 es un indicador del número de células precursoras adipocitarias, corrigiendo los niveles de expresión en función del aumento de CD34, observamos un incremento de 1,57 veces en los niveles de Pref-1 y una disminución de 0,04 veces en los de Zfp423. Nuestros resultados indicarían que el consumo de DRF en la gestación induce en su progenie una disminución del potencial adipogénico de la FEV que repercutiría en el número de adipocitos y la masa del TARP, favoreciendo la hipertrofia adipocitaria y cambios del perfil de secreción de adipoquinas. Estos cambios serían al menos en parte responsables del aumento de susceptibilidad a desarrollar las alteraciones metabólicas. (PICT 2013-0930, SUBSIDIO CIC, FPREDM062013).

448 (376) ROL DE LXRα/β Y PPARγ EN EL CONTROL DE LA EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN LA BIOSÍNTESIS Y SECRECIÓN DE LÍPIDOS EN CÉLULAS EPITELIALES MAMaríaS MURINAS AISLADAS

Diego Grinman[1]; Edith Kordon[12]; Paul Maclean[3]; Michael Rudolph[3]; Adali Pecci[12]
IFIBYNE-CONICET[1] Univ. de Buenos Aires, Fac. de Ciencias Exactas y Naturales, Depto. de Química Biologica[2] Universidad de Colorado, Facultad de Medicina, Division de Endocrinologia, Metabolismo y Diabetes[3]

Los Receptores X de Hígado (LXRs) y los Activados por Proliferadores de Peroxisomas (PPARs) controlan el metabolismo lipídico y de glucosa. Durante la lactancia la glándula maMaría sintetiza y secreta una gran cantidad de triacilglicéridos y ésteres de colesterol, convirtiéndose en el órgano con mayor producción lipídica del organismo. Trabajos recientes mostraron que en la transición preñez-lactancia murina, el mayor cambio en la expresión génica ocurre en genes involucrados en la biosíntesis y secreción de lípidos. Nuestro objetivo fue estudiar la participación de LXRα/β y PPARγ en la regulación de algunos de dichos genes en el epitelio mamario. Se aislaron células epiteliales maMarías (MECs) de ratones hembras C57BL/6 con 17 días de preñez (P17) y distintos estadios de lactancia (L2 a L10). Los niveles proteicos de LXRα y PPARγ aumentaron durante la lactancia respecto a la preñez, LXRβ no fue detectado. Mientras que en L5 los niveles de expresión detectados de ambos receptores fueron similares, LXRα aumentó 1.9±0.1 veces en L10 vs. L5 mientras que PPARγ disminuyó 1.7±0.1 veces. Contrariamente, PPARγ aumentó 4.4±0.7 veces en lisados totales de mama entre L2 y L10 indicando una fuerte regulación positiva en otro tipo celular, posiblemente adipocitos. También se observó un incremento en la señal nuclear de LXRα en L10 vs. P17. Finalmente, MECs de L5 fueron incubadas con 1 y 25µM de los agonistas de LXR y PPARγ (GW3965 y troglitazona, respectivamente). Hallamos que GW3965 aumenta la expresión de los transportadores de colesterol ABCA1 y ABCG1, mientras que el co-tratamiento con troglitazona bloqueó dicho incremento, sugiriendo que no sólo ambos receptores son susceptibles de ser activados sino que existiría un cross-talk entre ambas vías. Dado que LXR y PPARγ son blancos farmacológicos para el tratamiento de distintas patologías, consideramos crucial estudiar su rol en la síntesis y secreción de lípidos para validar fármacos administrados durante la lactancia.

449 (515) RELACIÓN ENTRE ENDOTELINA-1 Y PARÁMETROS METABÓLICOS E INFLAMATORIOS EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

Leonardo D Cacciagiú[1]; M L Muzzio[1]; G Demarziani[2]; A Elbert[2]; A I Gonzalez[1]; L Schreier[1]
Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica - INFIBIOC, UBA[1] Centro de Enfermedades Renales e Hipertensión Arterial (CEREHA)[2]

La enfermedad renal crónica (ERC) se asocia con alta mortalidad cardiovascular. La conjunción del perfil lipoproteico alterado, insulino-resistencia y estado proinflamatorio acelera la aterosclerosis. La endotelina-1 (ET1) es un péptido vasoconstrictor sintetizado en células endoteliales que podría sumarse al cuadro metabólico alterado y proinflamatorio, contribuyendo al riesgo cardiovascular. Objetivo: evaluar ET1 y su relación con el estado metabólico e inflamatorio en la ERC. Se estudiaron 50 pacientes con ERC en hemodiálisis (HD) y 20 sujetos sanos como controles (C) de ambos sexos y edad HD:61±17 años y C:32±10 $p<0,001$. En suero con 12 h de ayuno se midió LDL, HDL, remanentes lipoproteicos (RLP), triglicéridos (TG), glucosa, insulina, HOMA-IR, PCRus y ET1. Se aplicó Test *t* Student o *U* Mann-Whitney según distribución de datos y se ajustó por edad. El grupo HD con respecto al grupo C mostró TG y RLP aumentados (HD:143±88mg/dl *vs* C:79±31 y HD:54±29 *vs* C:15±7; $p<0,01$ respectivamente), mientras que HDL se encontró disminuido en HD:41±13 *vs* C:56±14; $p<0,01$. LDL no tuvo diferencias entre grupos. En cuanto a los parámetros de insulino-resistencia, los pacientes HD tuvieron mayor nivel de insulina con respecto a C (11,8(2,0-64,8)UI/L *vs* 5,4(2,0-11,3); $p<0,01$) como también mayor HOMA-IR: HD 2,1(0,7-12,7) y C 1,2(0,43-6,38); $p<0,01$. El grupo HD presentó PCRus elevada (5,2±3,2mg/L *vs* 0,5±0,7; $p<0,001$). Por otro lado, los niveles de ET1 fueron mayores en HD: 5,2(2,0-8,1)pg/mL con respecto a C: 0,6(0,2-3,4); $p<0,001$. Cuando se asoció ET1 con parámetros metabólicos e inflamatorios, se observó una correlación directa con LDL ($r=0,39$; $p<0,05$), RLP ($r=0,69$; $p<0,01$) y PCRus ($r=0,59$; $p<0,01$). En suma, los niveles de ET1 están aumentados en los pacientes en hemodiálisis y se podría relacionar con la acción directa sobre el endotelio de lipoproteínas aterogénicas como LDL y RLP, así como también el estado inflamatorio de los pacientes.

450 (573) ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE LAS INMUNOFILINA DE ALTO PESO MOLECULAR FKBP51Y FKBP52 EN TEJIDO ADIPOSO

Melina Daniela Muñoz Bernart; Nancy Lorena Charo; Antonella Lombardi; María Itati Rodríguez Ceschan; Judith Toneatto; Graciela Piwien-Pilipuk
IBYME

La obesidad constituye un serio problema para la salud debido a que el tejido adiposo es disfuncional contribuyendo al desarrollo de diversas enfermedades, como diabetes tipo 2. Recientemente demostramos que las inmunofilinas (INM) FKBP51 y FKBP52 se expresan de modo diferencial a lo largo del proceso de diferenciación de preadipocitos 3T3-L1, resultados que sugieren un balance de las mismas en el adipocito. Debido a que se desconoce la función de las INMs en el tejido adiposo, iniciamos dicho estudio. Análisis por WB demuestran que FKBP51 está presente tanto en tejido adiposo marrón (BAT), como en los diferentes depósitos de tejido adiposo blanco de ratón. Interesantemente, FKBP51 presenta diferentes patrones electroforéticos en BAT comparado con tejido blanco subcutáneo y visceral. En BAT FKBP51 presenta bandas con mayor movilidad electroforética compatible con la presencia de formas menos fosforiladas de la INM. Llamativamente el patrón electroforético de FKBP51 en BAT es semejante al de la INM en músculo esquelético o cardíaco, todos tejidos con alto número de mitocondrias. Tratamiento con fosfatasa alcalina de lisados de tejido blanco presentan un patrón semejante a BAT y músculo, aportando evidencia de presencia de FKBP51 con distinto grado de fosforilación en distintos tejidos.

BAT cumple un importante rol en el mantenimiento de la homeostasis térmica cuando el individuo se expone a frío. Análisis por WB de muestras de BAT provenientes de ratones expuestos 1 y 4 hs a 4°C evidencian aumento de expresión de FKBP51, particularmente de las bandas de mayor movilidad electroforética, de FKBP52 y de UCP1. Ambas inmunofilinas interactúan con CREB, uno de los factores de transcripción que regulan la expresión de UCP1. Ensayos de gen reportero indican que FKBP51 inhibe su actividad transcripcional mientras FKBP52 la incrementa. En su conjunto estos resultados sugieren que FKBP51 podría cumplir diferentes funciones ya sea que se trate de tejido adiposo marrón o blanco, diferencias que podrían depender de su grado de fosforilación, y en BAT el balance entre INMs podría regular la expresión de UCP1.

ONCOLOGÍA 6

451 (257) LA EXPRESIÓN DE GALECTINA-1 AUMENTA EN HÍGADOS PRENEOPLÁSICOS Y TUMORES HEPÁTICOS DE RATONES EXPUESTOS A ELEVADOS NIVELES DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO

María Lorena Bacigalupo; Veronica Gabriela Piazza; Silvina Otero; Ana Isabel Sotelo; Johanna Gabriela Miquet; María Fernanda Troncoso
IQUIFIB (UBA-CONICET), Dpto. Química biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

La hormona de crecimiento (GH) regula el crecimiento corporal y el metabolismo. Ratones transgénicos que sobre-expresan GH (GHTg) muestran un tamaño corporal aumentado, organomegalia y alteraciones endócrinas y metabólicas. Los ratones GHTg adultos jóvenes presentan una patología hepática preneoplásica similar a la observada en pacientes humanos con alto riesgo de contraer cáncer de hígado y, en edades avanzadas, estos animales desarrollan tumores en el hígado. Previamente observamos que la exposición prolongada a GH produce alteraciones en vías de señalización involucradas en el crecimiento, proliferación y supervivencia celular, similares a las encontradas en los tumores hepáticos humanos. Galectina-1 (Gal1), proteína que une β-galactósidos, se encuentra incrementada en los hepatocitos tumorales humanos. Su sobre-expresión se asocia a una mayor invasión tumoral, metástasis, recurrencia y menor sobrevida de los pacientes con carcinoma hepatocelular (HCC). Nuestro grupo describió que la sobre-expresión de Gal1 en células de HCC humano induce la transición epitelio-mesénquima y promueve el crecimiento tumoral y metástasis en ratones *nude*. El objetivo de este trabajo fue investigar cómo se altera la expresión de Gal1 en el hígado de ratones GHTg. Mientras que en homogeneizados de hígado de ratones normales el nivel de expresión de Gal1 fue indetectable (Western blot), en los hígados de ratones GHTg observamos una marcada expresión de Gal1 tanto en adultos jóvenes (2-3 meses, ♀n=4, ♂n=3) como de edad avanzada (11-14 meses, ♀n=13, ♂n=8). Además, detectamos un incremento en la expresión de Gal1 en los tumores hepáticos de ratones GHTg de edad avanzada con respecto a zonas no tumorales ($p<0,01$, n=21). Estos resultados indican que la exposición prolongada a altos niveles de GH induce la expresión de Gal1, tanto en hígados preneoplásicos como en los tumores, sugiriendo que ambas proteínas podrían promover sinergísticamente el desarrollo y progresión del HCC.

452 (327) ESTUDIO DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN FORKHEAD BOX (FOX) EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA

Javier Nahuel Brandani; Daiana Beatriz Leonardi; Geraldine Gueron; Elba Vazquez; Javier Cotignola
Departamento de Química Biologica,FCEyN,UBA/IQUIBICEN-CONICET

Gran cantidad de trabajos muestran que la desregulación de la expresión de los receptores hormonales es responsable del desarrollo y progresión del cáncer de próstata (CaP). El receptor de andrógenos (AR) y su vía de señalización es uno de los mecanismos involucrados en la progresión del CaP. Además, el receptor de glucocorticoides (GR) podría tener efectos tanto supresores tumorales como oncogénicos, dependiendo de la presencia/ausencia de un AR funcional y de la desregulación de cofactores de los receptores hormonales, como son los factores forkhead box (FOX). El objetivo del presente trabajo es estudiar la expresión de ciertos factores FOX en condiciones experimentales similares a las que se encuentran expuestas las células tumorales durante la progresión y tratamiento del CaP: estrés oxidativo, ausencia de andrógenos, presencia de glucocorticoides e inducción de HO-1 (enzima involucrada en la tumorigénesis prostática). La expresión génica se evaluó mediante RT-qPCR y la presencia de proteína por Western Blot en las líneas celulares PC3 (AR-, GR+) y C4-2B (AR+, GR+). Encontramos que la ausencia de testosterona en el medio de cultivo induce significativamente la expresión de FOXA1, FOXM1 y FOXO3 ($p<0,01$) en ambas líneas celulares. El tratamiento con dexametasona reduce la expresión de FOXA1 ($p<0,001$), y el tratamiento con agua oxigenada disminuye los niveles de FOXO1 y FOXO3 ($p<0,001$) en ambas líneas. La inducción de HO-1 por hemina aumenta un 50% el nivel de ARNm de FOXA1 en la línea PC3, mientras que en la línea C4-2B disminuye los niveles de todos los factores FOX estudiados. Los resultados demuestran que los estímulos hormonales similares a los inducidos durante el tratamiento de los pacientes con CaP, el estrés oxidativo y la inducción de HO-1 son capaces de modular la expresión de los FOX estudiados. En resumen, el conocimiento de la biología de los tumores prostáticos puede ayudar a desarrollar nuevos blancos terapéuticos.

453 (332) ASOCIACION DE HEMO OXIGENASA 1 CON PROTEÍNAS NUCLEARES EN CANCER DE PROSTATA

Federico Schuster; Alejandra V Paez; Emiliano G. Ortiz; Nicolas Anselmino; Sofia Lage Vickers; Javier H. Cotignola; Elba S. Vazquez; Geraldine Gueron
Departamento de Química Biologica, FCEyN, UBA / IQUIBICEN-CONICET

La inducción de Hemo Oxigenasa-1 (HO-1), representa un evento crítico en las respuestas celulares a los insultos prooxidativos e inflamatorios. Reportes previos de nuestro laboratorio muestran que HO-1 se expresa en carcinomas primarios prostáticos humanos y se localiza en el núcleo. En líneas celulares de PCa comprobamos que su inducción promueve su localización nuclear e inhibe la proliferación, migración e invasión y retarda el crecimiento de tumores in vivo. Ensayos de ChIP demostraron que HO-1 se asocia a promotores de genes relevantes en PCa como PSA. Nuestra hipótesis se basa en que HO-1 en el núcleo podría actuar como un co-regulador de la transcripción favoreciendo un fenotipo menos agresivo. Por lo tanto nuestro objetivo fue encontrar los interactores moleculares de HO-1 que fueran capaces de cumplir una función reguladora a nivel génico ya que HO-1 no posee dominios de unión al ADN. Para identificar proteínas nucleares asociadas a HO-1, se construyó la proteína recombinantes HO-1FLAG. Con estas construcciones se transfectó la línea celular PC3 para posterior inmunoprecipitación. Luego se procedió al estudio por MALDI-TOF/TOF y al análisis bioinformático. El análisis por ontología génica mostró que el 71% de las proteínas asociadas a HO-1 se encuentran reportadas como proteínas nucleares con funciones remodeladoras del estado de la cromatina, activadores y cofactores de la transcripción. En particular 6 proteinas, PURA, STAT3, ZNF589, AHCTF1, ARNTL2 & FTSJ3 son factores de transcripción asociados a HO-1. Para este set de proteínas realizamos un análisis de red de interacciones revelando que dichos factores se co-expresan o co-localizan. La detección de dichos factores asociadas a HO-1 evidencia un rol nuclear para esta proteína con potenciales implicancias en la regulación transcripcional del PCa.

454 (337) ROL DEL ERBB-2 NUCLEAR EN CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO

María Florencia Chervo[1]; Franco Izzo[1]; Leandro Venturutti[1]; Violeta Alicia Chiauzzi[1]; Mara De Martino[1]; Juan Cruz

Gómez Poviña[1]; Cecilia Proietti[1]; Pablo Guzmán[2]; Juan Carlos Roa[2]; Eduardo Hernán Charreau[1]; Roxana Schillaci[1]; Rosalía Inés Cordo Russo[1]; Patricia Virginia Elizalde[1]
Laboratorio de Mecanismos Moleculares de Carcinogénesis, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), CONICET, Buenos Aires, Argentina[1] Departamento de Anatomía Patológica (BIOREN), Universidad de La Frontera, Temuco, Chile[2]

El cáncer de mama triple negativo (CMTN) es un subtipo de cáncer de mama (CM) de mal pronóstico caracterizado por no presentar niveles clínicamente detectables de los receptores de estrógeno y progesterona, y por carecer de sobreexpresión o amplificación génica de ErbB-2. El receptor tirosina quinasa ErbB-2/HER2 posee un rol clave en CM. Notablemente, el ErbB-2 de membrana es capaz de migrar al núcleo celular donde actúa como factor de transcripción (FT). Nuestro grupo demostró que el ErbB-2 nuclear (NErbB-2) actúa también como coactivador del FT Stat3 promoviendo el crecimiento del CM. En este trabajo exploramos, mediante inmunofluorescencia (IF) y microscopía confocal, la presencia de NErbB-2 en CMTN observando niveles elevados de NErbB-2 en las líneas MDA-MB-468, MDA-MB-231 y MDA-MB-453, como así también en muestras de pacientes. Además, hallamos localización nuclear de Stat3 en líneas de CMTN y, sorprendentemente, encontramos una importante colocalización nuclear entre ErbB-2 y Stat3. A fin de evaluar el rol del NErbB-2 en la proliferación del CMTN, las células fueron transfectadas con una mutante de ErbB-2 humano (hErbB-2ΔNLS), la cual es incapaz de migrar al núcleo y actúa como un inhibidor dominante negativo de la translocación nuclear de ErbB-2 endógeno. Observamos que la mutante hErbB-2DNLS inhibió la localización nuclear de ErbB-2 en las células de CMTN y además suprimió la proliferación de las mismas, demostrando el rol central del NErbB-2 en la proliferación del CMTN. El significado clínico de la presencia nuclear de ErbB-2 fue evaluado por IF en microarreglos tisulares provenientes de una cohorte de 266 carcinomas invasivos primarios, dentro de los cuales 51 casos (23%) eran CMTN. El análisis de Kaplan-Meier demostró que la presencia nuclear de ErbB-2 es un marcador de mal pronóstico en pacientes con CMTN (p=0.045). Nuestros hallazgos revelan por primera vez la presencia y función del NErbB-2 en CMTN, proponiéndolo como un nuevo blanco terapéutico.

455 (360) PARTICIPACIÓN DEL INHIBIDOR DE QUINASAS DEPENDIENTES DE CICLINAS, P21WAF1/CIP1, EN LA RESPUESTA DE CÉLULAS MADRE DE GLIOMAS DERIVADAS DE PACIENTES FRENTE A AGENTES GENOTÓXICOS

Olivia Morris Hanon[1]; María Élida Scassa[1]; Vanesa Gottifredi[2]; Sabrina Florencia Mansilla[2]; Verónica Alejandra Furmento[1]; Damián Darío Fernandez Espinosa[1]; Horacio Martinetto[3]; Gustavo Emilio Sevlever[1]; Guillermo Agustín Videla Richardson[1]
Laboratorio de Investigación Aplicada a Neurociencias (LIAN). FLENI[1] Fundación Instituto Leloir[2] Departamento de Neuropatología y Biología Molecular. FLENI[3]

Los gliomas de alto grado son extremadamente agresivos e invasivos. En su progresión producen daño neurológico y se incluyen entre los tumores más mortales que existen. Actualmente se propone que los gliomas de alto grado son generados a partir de células madre tumorales (CMT), las cuales corresponden a una subpoblación minoritaria capaz de generar y propagar tumores al ser inyectadas en ratones inmunodeficientes. El cultivo de CMT derivadas de pacientes ofrece la posibilidad de realizar investigaciones traslacionales que contribuyan al desarrollo de terapias personalizadas. El objetivo de este trabajo consiste en evaluar la participación del inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas, p21Waf1/Cip1, en la respuesta celular de CMT frente a agentes que producen daño en el ADN. Para ello, utilizamos 5 líneas de CMT, las cuales han sido establecidas y caracterizadas previamente en nuestro laboratorio. En primer lugar, determinamos la viabilidad celular por citometría de flujo y tinción con ioduro de propidio y observamos que cada línea celular exhibe una sensibilidad particular frente a tratamientos con diferentes agentes genotóxicos. Realizando ensayos de RT-PCR en tiempo real determinamos que los niveles de expresión del ARNm de p21 son elevados en todas las líneas celulares analizadas y que el tratamiento con temozolamida o camptotecina conlleva a un aumento en la expresión del mismo. Además, mediante técnicas de inmunofluorescencia observamos que estos genotóxicos promueven la acumulación nuclear de p21, sugiriendo la participación de esta proteína en la respuesta al daño del ADN. Notablemente, al menos en una de las líneas empleadas, el silenciamiento transiente de p21 durante el tratamiento con camptotecina condujo a un aumento en la muerte celular. Estos resultados sugieren que la inhibición de p21 podría constituir un posible blanco terapéutico destinado a reducir la resistencia de estos tumores frente a tratamientos quimioterapéuticos.

456 (366) EFECTO DE HEMO OXIGENASA 1 EN LA INTERACCIÓNENTRE CÉLULAS DE CÁNCER PRÓSTATA Y CÉLULAS PROGENITORESDEL HUESO TULO

Nicolás Anselmino; Daiana B. Leonardi; Javier Cotignola; Geraldine Gueron; Elba S. Vazquez
DPTO. QUÍMICA BIOLÓGICA, FCEYN, UBA- IQUIBICEN, CONICET

El perfil de diseminación del cáncer de próstata (PCa) muestra tendencia a desarrollarse en el hueso, donde las células tumorales interactúan con el microambiente interrumpiendo el equilibrio del tejido óseo. La inflamación es uno de los principales factores de riesgo para esta enfermedad. Hemo oxigenasa 1 (HO-1) emerge como blanco potencial en el PCa, manteniendo la homeostasis celular y contrarrestando la disminución de la proliferación de osteoblastos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la función de HO-1 en la interacción del microembiente tumoral y fenotipo menos agresivo y la progresión ósea de la enfremedad a través de un enfoque proteómico y bionfoón célula prostática/célula progenitora del hueso. Se utilizó un sistema de co-cultivo de células PC3 (derivada de PCa humano) con células MC3T3 (precursores de osteoblastos murinos) o con células Raw 264.7 (precursores de osteoclastos murinos), en el cual las líneas celulares comparten el medio sin estar en contacto directo. Las células PC3 fueron pre-tratadas o no con hemina (inductor de HO-1, 50μM, 24h) antes del co-cultivo. Mediante RT-qPCR, utilizando primers específicos humanos y murinos, evaluamos el efecto del co-cultivo y de HO-1 sobre la expresión de genes implicados en la reacción ósea y la tumorigénesis. La expresión de DKK1, IL6, IL8 y PTHrP, se vio alterada (*P<0,05*) en PC3 Co-cultivadas con MC3T3 o con Raw 264.7. En MC3T3 el co-cultivo modificó (*P<0,05*) la expresión de Col1a1, Hes1, OPG, OPN. En Raw 264.7 el co-cultivo indujo cambios (*P<0,05*) en la expresión de OPN, mientras que FOXO1 y RANK solo se vieron modificados (*P<0,05*) cuando el Co-cultivo se realizó con PC3 pre-tratadas con hemina. Se estudió la diferenciación de células Raw 264.7 a osteoclastos activos mediante el cultivo de estas células durante 8 días sobre una matriz de dentina en medio de diferenciación, y se analizó la capacidad para formar hoyos de degradación. En conjunto estos resultados demuestran que existen factores solubles que alteran la expresión de genes involucrados en la respuesta ósea, tanto en las células tumorales como en las precursoras de hueso.

457 (387) SINERGISMO ENTRE TRIÓXIDO DE ARSÉNICO YUN INHIBIDOR DE PROTEASOMA EN CÉLULAS DE LINFOMADE BURKITT LOGRADO MEDIANTE INHIBICIÓN DEMITOFAGIA

TOMÁS LOMBARDO[1]; Cintia Y Mihalez[1]; Daniela L Papademetrio[1]; Susana N Costantino[1]; Laura Kornblihtt[2]; Elida M Alvarez[1]; Guillermo A Blanco[1]
IDEHU[1] Servicio de Hematología, Htal de Clínicas José de San Martín[2]

El trióxido arsénico (TOA), cuyo blanco es la mitocondria, se utiliza con éxito en leucemia promielocítica, pero otras leucemias/linfomas resultan resistentes. Hemos demostrado que la combinación de TOA con el inhibidor de proteasoma MG132, es antagónica

en la línea celular Raji (Linfoma de Burkitt) y esta resistencia se asocia a una pérdida de masa mitocondrial. La eliminación mitocondrias dañadas por vía autofágica (mitofagia) es un mecanismo de resistencia identificado en algunas neoplasias agresivas. El acído valpróico (VPA) y la vincristina (VCR) son capaces de inhibir el proceso mitofágico.Nos propusimos entonces evaluar si la inhibición del proceso de resistencia mitofágico por medio VPA+VCR genera una sensibilización de la línea Raji al efecto citotóxico de la combinación TOA+MG132Para esto, se cultivaron las células por 72hs con TOA+MG132 en presencia y ausencia de concentraciones sub-letales de VPA y VCR. La citotoxicidad se evaluó por citometría de flujo con FDA/IP. El tipo de interacción se evaluó mediante el cálculo del índice de combinación (IC) (IC>1 antagonismo, IC<1 sinergismo, IC=1 aditivo). La mitofagia se analizó por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia con las sondas mono-dancyl-cadaverina (MDC), mitotracker red (MTK), y nonyl-naranja-acridina (NAO) y TMRE.El co-tratamiento con VPA+VCR generó un aumento significativo ($p<0.05$) de la masa mitocondrial y del porcentaje de células con mitocondrias despolarizadas indicando que las mitocondrias dañadas no se eliminaban. Para todos los niveles del efecto citotóxico (0-100%), el IC de ATO+MG en presencia de VPA+VCR fue <1, indicando sinergismo.Podemos concluir entonces que VPA+VCR a dosis subletales inhiben la mitofagia evitando la eliminación de las mitocondrias dañadas y que TOA+MG132 en presencia de VPA+VCR se comporta de manera sinérgica, aumentando así la potencia del tratamiento.

458 (391) ANGIOTENSINA (1–7) INHIBE EFECTOS DESENCADENADOS POR ANGIOTESINA II EN CÉLULAS MAMA- RIAS NORMALES Y TUMORALES

Nadia Cambados[1]; Thomas Walther[2]; Edith C. Kordon[1]; Carolina Schere Levy[1]
IFIBYNE-CONICET, FCEN, UBA[1] Medizinische Fakultät Kinderchirurgie-Fetalzentrum, Universität Leipzig, Alemania[2]

Angiotensina II (AngII) y angiotensina 1-7 [Ang(1-7)] son péptidos del sistema renina angiotensina que median importantes funciones biológicas como proliferación, apoptosis y remodelado tisular. AngII favorecería el crecimiento y desarrollo tumoral, mientras que Ang(1-7) tendría un efecto inhibitorio. Nuestro objetivo es comparar los roles de Ang-(1-7) y AngII en líneas celulares maMarías normales y tumorales. En células epiteliales NMuMG encontramos que AngII indujo activación de AKT a partir de 1 min, mientras que Ang(1-7) lo hizo a los 15 min. La estimulación simultánea con ambas angiotensinas produjo un patrón de activación de AKT similar al desencadenado por Ang(1-7) anulando los efectos observados con AngII. Tratando con bloqueantes farmacológicos de los receptores AT1 y AT2 de AngII, encontramos que la fosforilación de AKT se produce principalmente vía AT1 y al tratar las células con bloqueantes farmacológicos de los receptores MAS y MRGD de Ang(1-7), observamos mayor activación de AKT vía el receptor MAS. En ensayos de migración mediante *transwell*, observamos que AngII aumentó significativamente la capacidad migratoria de células tumorales MDA-MB23 (AngII vs C, $p<0.001$) y el pre-tratamiento con Ang(1-7) inhibió la migración inducida por AngII a valores similares al control (AngII vs AngII + Ang(1-7), $p<0.01$). Confirmamos dichos efectos a través de ensayos de migración por herida en dicha línea celular y en la línea tumoral murina LM3. Por último, demostramos que AngII es capaz de inducir la transición epitelio-mesenquimal en células epiteliales NMuMG, a través de una disminución significativa en la expresión de marcadores epiteliales como e-cadh (AngII vs C, $p<0.001$) y un aumento significativo en la expresión de los marcadores mesenquimales fibronectina, n-cadh y acta2 (AngII vs C, $p<0.001$). Conclusión: En células maMarías normales y tumorales AngII y Ang(1-7) tendrían efectos contrapuestos y Ang(1-7) podría inhibir los efectos desencadenados por AngII

459 (394) ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO QUIMIOPREVENTIVO DE MAITAKE PRO4X Y TAMOXIFENO EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER DE MAMA EN RATONES

Diego Maximo Aguilera Braico; Valeria Torralba Agu; Tomas Santa Coloma; Gabriela Andrea Balogh
BIOMED

En este trabajo comparamos los efectos quimiopreventivos del Tamoxifeno con la Fracción D de Maitake Pro4X. Empleamos 20 ratones hembras BALBc de 6-8 semanas de vida, que fueron divididas en 4 grupos: Grupo Control, Grupo Tratado con Fracción D (5 mg/kg peso corporal), Grupo Tratado con Tamoxifeno (20mg/animal) y Grupo Tratado en forma conjunta con Fracción D y Tamoxifeno a las dosis indicadas. La administración se realizó diariamente por vía oral durante 50 días consecutivos (período equivalente a 5 años humanos). Luego de este periodo, se indujo tumorigénesis maMaría por inyección intraperitoneal de $2x10^5$ células LM3, y se procedió a determinar desarrollo tumoral mamario, sobrevida y mortalidad hasta el día 27 post-tumorigénesis. Los resultados observados demostraron que la Fracción D Pro4X previene la carcinogénesis maMaría en un 40%, en comparación con Tamoxifeno que solo previno en un 25%, mientras que en conjunto Tamoxifeno + Maitake Pro4X indujeron un 80% de prevención tumoral. Cabe señalar que el 100% de los animales del grupo control desarrollaron tumor mamario. Por otro lado observamos que Tamoxifeno indujo una mortalidad del 20%, comparado con el 0% en los grupos tratados con Maitake Pro4X, solo y en conjunto con Tamoxifeno. La mortalidad del grupo control fue del 40%. Observamos que los ratones del grupo tratado con Tamoxifeno poseen significativamente un incremento del nivel de bilirrubina total (y Bilirrubina Indirecta) con respecto a los controles y al Maitake solo. Como conclusión, los datos sugieren que Maitake Pro4X, no solo previene en un mayor porcentaje el desarrollo de tumorigenesis maMaría, comparada con Tamoxifeno sino que también mejora la sobrevida total relativa de los animales y mejora los parámetros bioquímicos y hematológicos. Quizas Maitake Pro4x podría actuar como co-adyuvante del Tamoxifeno en la prevención de la carcinogénesis maMaría. Este proyecto fue subsidiado por el BIOMED-UCA-CONICET.

460 (416) EFECTOS ANTITUMORALES INDUCIDOS POR UNA METALODROGA DE VANADIO SOBRE UN MODELO IN VITRO E IN VIVO DE OSTEOSARCOMA HUMANO

Ignacio E León[1]; Juan F Cadavid Vargas[1]; María C Vercellini[2]; Agustina Resasco[2]; Fabricio Maschi[2]; Miguel Ayala[2]; Cecilia Carbone[2]; Susana B Etcheverry[1]
Fac. de Cs. Exactas[1] Fac. de. Cs. Veterinarias[2]

El osteosarcoma (OS) es el tumor maligno óseo primario más frecuente en niños y adultos jóvenes. Es por esto que con el fin de mejorar el bienestar y la supervivencia de los pacientes, una comprensión amplia de los mecanismos en OS se considera vital en la identificación de nuevos fármacos para un tratamiento más eficaz. El vanadio es un elemento traza esencial para formas inferiores de vida. Tiene un rol clave en el funcionamiento de diversas enzimas y además sus compuestos presentan interesantes propiedades biológicas. Los complejos de vanadio con flavonoides han resultado muy atractivos desde un punto de vista farmacológico dado que han demostrado promisorios resultados como antitumorales en diversos modelos de estudio.

En el presente trabajo se generaron los modelos 3D *in vitro* e *in vivo* en ratones N:NIH(S) $Fox1^{nu}$ utilizando células MG-63 de osteosarcoma humano. Por otro lado, se estudiaron los efectos antitumorales de un complejo de vanadio con crisina (VOcris) en ambos sistemas de estudio. Los resultados evidenciaron la formación de esferoides (3D) de 330 ± 14 mm^2 luego de 7 días de desarrollo y la generación de un tumor luego de 60 días de 246± 47 mm^2 y 451± 49 mm^2 en ratones machos y hembras respectivamente. Además, VOcris disminuyó la viabilidad celular de los esferoides en un 40% luego de 72 h de tratamiento, afectando el volumen y la forma de los mismos ($p<0.01$). Los resultados de los tratamientos con 5,5 y 27,5 mg/ Kg de VOcris durante 11 días sobre los tumores en hembras mostraron una disminución del volumen tumoral sin afectar el peso del animal. Los valores tumorales luego de 6 días de tratamiento fueron: 314± 32, 197± 9* y 117± 18* para el control y ambos tratamientos (*$p<0.01$). Estos resultados sugieren que el complejo VOcris posee una notoria actividad antitumoral comprobada para los modelos de osteosarcoma humano *in vitro* e *in vivo* siendo un buen candidato para desarrollar nuevas terapias alternativas contra osteosarcoma.

461 (417) EFECTOS ANTITUMORALES DEL ANÁLOGO DE CALCITRIOL UVB1 SOBRE EL CARCINOMA COLORECTAL

María Julia Ferronato[1]; Eliana Noelia Alonso[1]; Norberto Ariel Gandini[1]; Diego Javier Obiol[1]; María Eugenia Fermento[1]; Mario Alfredo Quevedo[2]; Julian Arevalo[3]; Alejandro Lopez Romero[4]; Yagamare Fall[5]; Alejandro Carlos Curino[1]; María Marta Facchinetti[1]

Laboratorio de Biología del Cáncer, INIBIBB-CONICET, Bahía Blanca, Argentina[1] Dpto. Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina[2] Servicio de Patología del Hospital Interzonal de Agudos Dr. José Penna, Bahía Blanca, Argentina[3] Dpto. de Hematología, Laboratorios IACA, Bahía Blanca, Argentina[4] Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Vigo, España.[5]

El calcitriol presenta potentes efectos antineoplásicos pero su potencial utilización terapéutica se ve afectada por su actividad hipercalcemiante. Por ello se sintetizan análogos con el fin de reducir la actividad hipercalcemiante. Resultados previos muestran que el nuevo análogo de calcitriol UVB1 ejerce efectos antiproliferativos y antimigratorios sobre varias líneas celulares de cáncer y no posee actividad hipercalcemiante. Los objetivos de este trabajo fueron evaluar la acción antineoplásica del UVB1 sobre el cáncer colorectal, empleando la línea HCT116, tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo,* y modelar la unión del UVB1 al receptor VDR mediante ensayos *in silico*. Los estudios de *docking* molecular, complementados con dinámica molecular clásica y análisis energéticos de interacción con VDR, indican que UVB1 se une al VDR de manera homóloga a calcitriol. *In vitro* el análogo redujo la viabilidad celular de la línea HCT116 en comparación con su vehículo (WST1 y conteo manual, 100 nM, 96 hs, $p<0,01$; 0.1-100 nM, 120 hs, $p<0,001$). El aumento de células en la fase sub G_0/G_1 (citometría de flujo, $p<0,001$), el incremento de células TUNEL positivas ($p<0,05$) y el aumento de la expresión proteica de Bax, en las células tratadas con UVB1 indican que el análogo produce muerte celular por apoptosis. Además, el UVB1 redujo la migración celular (ensayo de la herida, $p<0,01$) y aumentó la expresión de E-caderina. Los estudios *in vivo* mostraron una reducción del volumen tumoral en los animales tratados con UVB1 (40 µg/kg, durante 4 semanas) con respecto a su vehículo (modelo de xenotransplante de células HCT116, 1,815 ± 0,30 vs 4,984 ± 1,35 mm^3, $p<0,05$). El análogo no afectó la expresión de Ki67 mientras que aumentó la expresión de E-caderina ($p<0,01$) y -catenina citoplasmática ($p<0,05$) por inmunohistoquímica en los tumores de los animales. Los resultados obtenidos demuestran que el UVB1 podría ser un agente terapéutico efectivo en el tratamiento de carcinomas colorectales.

462 (427) LA EXPRESIÓN DE B-CATENINA EN MEMBRANA EN RATAS HIPOTIROIDEAS SE ASOCIA A MAYOR APOPTOSIS POR ACTIVACIÓN DE LA VÍA INTRÍNSECA

Constanza Matilde Lopez Fontana; Leila Ester Zyla; Flavia Santiano; Corina Verónica Sasso; Virginia Pistone Creydt; Mariel Andréa Fanelli;Rubén Walter Carón

IMBECU

El hipotiroidismo experimental aumenta la latencia y disminuye la incidencia de cáncer de mama (CaM) en ratas, favoreciendo la apoptosis sin cambios en la proliferación celular. Por su parte, la distribución subcelular de B-catenina condiciona el pronóstico de CaM. Sin embargo, la relación entre los estados tiroideos y la vía de señalización de la B-catenina en el CaM no ha sido aún dilucidada. El objetivo de este trabajo fue estudiar la relación entre la expresión y localización de B-catenina y la apoptosis en tumores mamarios inducidos con dimetilbenzantraceno (DMBA) en ratas con diferentes estados tiroideos. Ratas hembras Sprague-Dawley fueron tratadas p.o. con una dosis de DMBA (15mg/rata) a los 55 días de edad y divididas en dos grupos: eutiroideas (EUT, n=17) e hipotiroideas (HypoT, 0.01% PTU en el agua de beber, n=26). Se tomaron muestras de sangre troncal para la determinación de hormonas por RIA, y glándula maMaría normal y tumores para estudios histopatológicos, inmunohistoquímicos, cuantificación de cuerpos apoptóticos y western blot. Se analizó estadísticamente por T de Student y Chi cuadrado. Los tumores de las ratas HypoT mostraron una apoptosis aumentada evaluada por el índice apoptótico, Caspasa 3, y TUNEL ($p<0.05$). La expresión de BAX fue significativamente mayor en las HypoT que en las EUT ($p<0.05$) y la relación BAX/Bcl2 mostró una tendencia a ser más elevada en las HypoT. Además, el aumento de la Caspasa 9 clivada en este grupo corroboró la activación de la vía intrínseca. Cabe destacar que, la B catenina se expresó en membrana y con menor intensidad en las ratas HypoT, mientras que la localización fue nuclear y de mayor intensidad en las EUT ($p<0.05$). En conclusión, la menor expresión de B-catenina y su localización normal en membrana en tumores mamarios se asocian a mayor apoptosis mediada por la activación de la vía intrínseca en ratas hipotiroideas.

463 (438) ESTUDIO DE LOS LINFOCITOS CD4+ Y CD8+ EN UN MODELO DE INMUNOEDICIÓN TUMORAL

Antonela Del Giudice[1]; Eduardo A. Roggero[1]; Mauricio Menacho-Márquez[12]; O. Graciela Scharovsky[13]; María J. Rico[12]; Viviana R. Rozados[1]

Instituto de Genética Experimental, Fac. Ciencias Médicas, UNR[1] CONICET[2] CIC-UNR, Rosario[3]

El adenocarcinoma de mama M-406 (M-406) inoculado en la línea endocriada CBi/L presenta las tres etapas de la Inmunoedición Tumoral: eliminación (EL), equilibrio (EQ) y escape (ES). Nuestro objetivo fue determinar el infiltrado leucocitario y los niveles de células $CD4^+$ y $CD8^+$ intratumorales en muestras provenientes de CBi/L en las tres etapas de la Inmunoedición Tumoral. Para ello, se inocularon con M-406 s.c. animales CBi/L y cuando el tumor presentaba las fases de EL, EQ o ES, se extrajeron muestras de sangre y tumor. Los tumores se incluyeron en parafina y cortes de los mismos fueron teñidos con hematoxilina-eosina, para evaluar el infiltrado leucocitario que se cuantificó utilizando el siguiente score: 0 (nulo), 2 (escaso), 4 (moderado) y 6 (alto). Las células $CD4^+$ y $CD8^+$ se cuantificaron por inmunohistoquímica en 30 campos de alta magnificación. En cuanto al infiltrado leucocitario, no se encontraron diferencias significativas entre las tres fases, EL, EQ y ES. Se observó un menor número de células $CD4^+$ [mediana (rango)/campo: 6(3-6)] y de $CD8^+$ [2(2-3)] en los tumores provenientes de ES comparados con los que estaban en EL [7(0-19)]; (13(1-17)] y en EQ [10(3-19]; [3(3-9)], aunque la diferencia no llegó a ser significativa. Este hallazgo va en contraposición a lo observado previamente en sangre, donde los niveles de ambas poblaciones celulares, evaluadas por citometría de flujo, fueron menores en EL comparados con EQ y ES ($P<0,01$). En EL, el cociente $CD4^+/CD8^+$ fue significativamente mayor en sangre comparado con el del tejido tumoral ($P<0,05$), sin observarse diferencias en las otras fases. Nuestros resultados sugieren que si bien el número de células $CD4^+$ y $CD8^+$ presentes en sangre y en los tejidos no explican las tres fases de inmunoedición observadas, la menor relación $CD4^+/CD8^+$ en tumor en EL podría, en parte, explicar el rechazo tumoral. El estudio de otras subpoblaciones celulares nos permitirá una mejor caracterización de este modelo.

464 (449) DERIVADOS DEL QUIMIOTERAPÉUTICO DE ORIGEN NATURAL DE BETA-LAPACHONA: VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL EN MELANOMA

Maríanela Chiaramello[1]; María Julia Lamberti[1]; Sabrina Ferreira[2]; Natalia Belén Rumie Vittar[1]; Viviana Alicia Rivarola[1]

Univ. Nac. de Rio Cuarto[1] Universidad E Federal Fluminense[2]

El melanoma es un tumor maligno derivado de alteraciones en los melanocitos, encargados de la síntesis de melanina. La melanogénesis está asociada a la inducción de la enzima NQO1 (NADPH quinona oxidoreductasa-1), la cual se encuentra sobreexpresada en tumores como estrategia de supervivencia. En estudios previos, hemos demostrado que la terapia fotodinámica (TFD) induce la expresión de NQO1 en tumores. β-Lapachona (β-Lap) es una o-naftoquinona con actividad antitumoral ex-

traída del Lapacho cuya citotoxicidad está mediada por NQO1. Aquí se propuso determinar la eficiencia terapéutica de β-Lap y sus derivados sobre diferentes líneas de melanoma. Las células B16-F10 (murinas) y SK-Mel-28 (humanas) fueron incubadas con dosis crecientes de β-Lap durante 24 h. Se demostró que la viabilidad celular, evaluada a través del ensayo MTT, disminuyó de forma proporcional a la concentración. La línea B16-F10 fue más resistente al quimioterapéutico (DL50, dosis letal 50: 2.00±0.05 μM) en comparación con SK-Mel-28 (DL50: 1,60±0.05 μM). Para determinar si la citotoxicidad está regulada por NQO1, las células fueron incubadas con β-Lap en presencia o ausencia de dicumarol (inhibidor competitivo de la enzima). De esta manera, se demostró que en la línea SK-Mel-28 la actividad de β-Lap fue dependiente de NQO1. Por ello, a continuación, 17 quimioterapéuticos derivados de β-Lap fueron ensayados sobre estas células. Los compuestos con mayor potencial antiproliferativo resultaron: PFB, PCIB, EB, PBB, AMEB y PMEB. En base a lo observado, estudios posteriores estarán abocados a la selección del agente superador, según criterios de toxicidad tumoral selectiva y mecanismo de acción dependiente de NQO1. Esto permitirá desarrollar estrategias basadas en terapias combinadas que conjuguen el poder inductor de NQO1, como reportamos con la TFD, con el derivado sobresaliente en su acción contra el melanoma.

465 (450) IMPLICANCIA DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES EN LA RESISTENCIA A LA TERAPIA FOTODINÁMICA DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMAMULTIFORME HUMANO

Laura Milla[1]; Cesar Prucca[2]; Lucia Rodríguez[1];Rodrigo Palacios[1]; Faviola Velazquez[2]; Beatriz Caputto[2]; Viviana A. Rivarola[1]
Univ. Nac. de Rio Cuarto[1] Univ. Nac. de Cordoba[2]

La terapia fotodinámica (TFD) contra el cáncer involucra la administración de un fotosensibilizador (FS) seguida de su activación por luz visible. Una novedosa aplicación de este tratamiento es sobre tumores cerebrales, como el glioblastoma multiforme humano (GBM). El problema central de todas las terapias oncológicas, incluyendo la TFD, es la presencia de células resistentes. Se ha propuesto que solamente una pequeña fracción de las células neoplásicas, llamadas células madre tumorales (CMT), tienen el potencial de generar un tumor y que estas son las responsables de la resistencia a los tratamiento oncológicos. El objetivo del presente trabajo fue determinar si las CMT de GBM de la línea T98G, son responsables de la resistencia a la TFD. Para ello, se obtuvo una población de células T98G resistentes a la TFD (R) empleando el compuesto Me-ALA como precursor del FS. Se analizó el contenido intracelular del FS luego de incubar el Me-ALA en poblaciones R, comparando con las parentales, las que nunca recibieron TFD (microscopía de fluorescencia y citometría de flujo), se determinó la capacidad tumorigénica (ratones inmunodeprimidos), la capacidad de crecimiento in vitro (ensayo clonogénico) y se midió la expresión de un marcador de CMT: CD44, en las poblaciones R (Western Blot). El contenido del FS en la población R fue menor que en las células parentales. Aunque en cultivos in vitro, la población R mostró igual capacidad de crecimiento, se observó una mayor capacidad tumorigénica cuando esta fue inyectada en ratones. La expresión del marcador CD44 fue igual en células R, comparando con los controles de las parentales. Las CMT podrían estar involucradas en la resistencia a la TFD. Otros marcadores, diferentes a CD44, o combinaciones de distintos marcadores de CMT, podrían identificar a estas poblaciones R. Además, estas células acumulan menos FS, lo cual podría deberse a la expulsión de este o de su precursor al exterior de las células, la incapacidad del ingreso del Me-ALA al interior de las células o alteraciones en la vía de síntesis de la PpIX. Los resultados obtenidos nos alientan a continuar investigando con más detalle sobre estos mecanismos de resistencia con el fin de encontrar blancos terapéuticos para mejorar la eficacia de la TFD para su aplicación en GBM.

466 (451) ESTUDIO DE DROGAS ANTINEOPLÁSICAS COMO POSIBLES POTENCIADORES DE LA TERAPIA GÉNICA EN CÉLULAS DE MELANOMA FELINO Y CANINO

Lucrecia Agnetti; Marcela S. Villaverde; Gerardo C. Glikin; Liliana M. E. Finocchiaro
Instituto de Oncología Dr Ángel H Roffo

En el presente trabajo se propuso estudiar el potencial terapéutico de la geno-terapia en combinación con bleomicina (BLM) o dicloroacetato (DCA) en 4 líneas celulares de melanoma mucoso felino (Dc y Rn) y canino (Bk y Rk) establecidas en nuestro laboratorio. Todas las líneas resultaron sensibles a la terapia génica cuando se lipofectaron las monocapas (mc) con los genes del interferón beta (cIFN-ß y feIFN-ß, canino y felino respectivamente) o sistema de gen suicida HSVtk/GCV (GS), observándose un mayor efecto del IFN-ß para las líneas felinas y del GS en el caso de las caninas ($p<0,001$). Al cultivarse como esferoides (esf), todas las líneas mantuvieron la sensibilidad al IFN-ß, a diferencia de lo observado con el GS, sólo efectivo en el caso de Bk ($p<0,01$). La necesidad de un umbral de células que expresen el transgen y la baja lipofección de las líneas felinas podrían explicar la ineficacia del GS observada en los esf de estas líneas. Las drogas BLM y DCA generaron un gran efecto *per se* sobre Rn (mc) y Dc (mc y esf), disminuyendo significativamente la sobrevida respecto del tratamiento genético. En esta última, ambas drogas potenciaron el efecto del IFN-ß ($p<0,05$). La combinación IFN-ß + BLM fue la única que logró este efecto sobre los esferoides de Rn ($p<0,05$). Debido a la elevada respuesta de Bk y Rk al GS, la citotoxicidad no varió al combinarse con BLM o DCA. Un efecto sumatorio significativo se evidenció en ambas líneas cuando se combinaron IFN-ß y DCA ($p<0,05$). La eficiencia de lipofección alcanzada en las 4 líneas fue menor al efecto citotóxico de los genes, lo cual podría evidenciar un efecto *bystander*. Se observó una correlación entre dicho efecto y los niveles intracelulares de ROS cuando fueron determinados por citometría (DCF). Por lo tanto, el tratamiento genético con IFN-ß fue altamente efectivo como terapia antitumoral *in vitro*. Drogas como BLM o DCA podrían aumentar su citotoxicidad, siendo menor su potencial en combinación con el sistema de GS.

467 (453) METFORMINA EN COMBINACION CON 2-DESOXIGLUCOSA COMO ESTRATEGIA TERAPEUTICA EN UN MODELO CELULAR DE CARCINOMA MAMARIO FELINO

María Florencia Arbe; Chiara Fondello; Lucrecia Agnetti; Gerardo Claudio Glikin; Liliana Mara Elena Finocchiaro; Marcela Solange Villaverde
Unidad de Transferencia Genética Área Investigación Instituto de Oncología Dr Angel Roffo Facultad de Medicina UBA

La glucólisis es la principal vía de obtención de energía en la mayoría de las células tumorales. Su interrupción o modulación resulta una interesante estrategia terapéutica. Previamente, describimos el efecto de metformina (MET, hipoglucemiante oral, activador de la AMPK y bloqueante de FOX) sola o combinada con 2-desoxiglucosa (2DG, inhibidor de la HK) en monocapas de AIRB, línea celular de carcinoma mamario felino (CMF), negativa para los receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP) y positiva para HER2. El objetivo del presente trabajo fue investigar si MET sola o en combinación con 2DG era efectiva en AIRATN, variante celular de CMF triple negativa (RE^-, RP^- y HER^-), comparar la respuesta entre monocapa (MC) y esferoides (ESF) y con la variante HER2 positiva, AIRB. Las células fueron sembradas en MC o sobre una cubierta de agar sólido, como ESF. Luego de 24 h (MC y ESF) o a los 4 d de siembra (ESF formados) se agregó MET (1 mM) y 2DG (0,5 mM) solos o combinados entre sí, MET/2DG (1 mM/0,5 mM). Además, se realizaron curvas con concentraciones de MET (0,1-10 mM) o 2DG (0,5-10 mM) para comparar las IC50. Luego de 5 d (MC) o 9 d (ESF) se determino la viabilidad (APH). Las MC de AIRATN mostraron una leve resistencia comparado con las MC de AIRB ($p<0,01$). Si bien los ESF de AIRB (únicos y pequeños) sobrevivieron, no proliferaron en las condiciones evaluadas. AIRATN desarrolló múltiples ESF de rápido crecimiento. Los ESF de AIRATN resultaron más sensibles a MET que sus MC ($p<0,01$) e incluso que los ESF de AIRB ($p<0,01$). El agregado de 2DG (0,5 mM) no resulto

citotóxico *per se*. Sin embargo, 2DG (0.5 mM) potenció el efecto de MET (p<0,01) en las MC de AIRB y en los ESF de AIRATN. Los resultados hasta aquí obtenidos alientan a continuar con los estudios de la inhibición del metabolismo energético tumoral como un posible blanco terapéutico para el CMF en particular y la patología maMaría en general.

468 (456) IMPACTO DE HEMO-OXIGENSASA 1 EN LA TRANSICION EPITELIAL–MESENQUIMAL DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

Sofia Lage Vickers; Nicolas Anselmino; Emiliano German Ortiz; Federico Schuster; Alejandra Veronica Paez; Javier Hernan Cotignola; Felipe Jaworski; Elba Susana Vazquez; Geraldine Gueron
Departamento de Química Biologica, FCE y N, UBA/IQUIBICEN-CONICET

La inflamación y la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), aumentan la tumorigénesis del cáncer de próstata (PCa) y un microambiente inflamatorio crónico es un factor decisivo en la inducción de la transición epitelial – mesenquimal (EMT). Hemo- oxigenasa 1 (HO-1), la enzima limitante en la degradación del grupo hemo, mantiene la homeostasis celular reduciendo la injuria oxidativa y atenuando la inflamación. Previamente en nuestro laboratorio comprobamos que la inducción farmacológica y genética de HO-1 inhibe la proliferación, migración e invasión, retarda el crecimiento de tumores *in vivo* y limita la angiogénesis asociada al tumor. En este trabajo analizamos la regulación de genes asociados a la EMT por sobre-expresión farmacológica y genética de HO-1. Por medio de un análisis de microarray observamos que HO-1 modula la expresión de genes asociados a la EMT y la adhesión celular. Validamos dichos resultadospor PCR en tiempo real (qPCR). Cabe destacar que entre los genes regulados por HO-1 se encontraron BMP7, TIMP1, WNT11, CAV2, SSP1, E-caderina y B-catenina (p<0,05), genes íntimamente asociados a la carcinogénesis prostática. Adicionalmente analizamos la expresión de dichos genes utilizando las bases de datos Oncomine. Esta herramienta permite identificar si los genes estudiados tienen una alta significancia estadística en la patogénesis clínica. El análisis reveló una correlación directa entre los estudio *in vitro* y las muestras de pacientes. Por inmunofluorescencia se observó una importante relocalización de E-cadherina y B-Catenina hacia la periferia celular bajo inducción de HO-1. Estos resultados revelan una función novedosa de HO-1 involucrada en la EMT del PCa, favoreciendo así la adquisición de un fenotipo menos agresivo y apoyando su función anti-tumoral en el PCa.

469 (458) EFECTO CITOTÓXICO DEL TRATAMIENTO CONJUNTO DE SORAFENIB (SFB) Y LOS INHIBIDORES DE SIRTUINA 1 (SIRT1) CAMBINOL (CAMB) Y EX527 (EX) EN CULTIVOS 2D (MONOCAPA) Y 3D (ESFEROIDES) DE LA LÍNEA CELULAR DE HEPATOCARCINOMA (HCC) HUH7

María P Ceballos; Ariel D Quiroga; María De Lujan Alvarez; Juan P Parody; Alejo Capiglioni; Flavia Lambertucci; Aldo D Mottino; María C Carrillo
IFISE

Sfb es la única droga aprobada para tratar el HCC. Muchos pacientes generan resistencia por inducción de transportadores ABC que expulsan la droga o requieren reducción de dosis por aparición de efectos adversos. SIRT1 está sobreexpresada en el HCC e induce la expresión de transportadores ABC. Objetivo: evaluar los efectos de combinar Sfb con Camb y Ex en Huh7. Métodos y resultados: Cultivos 2D y 3D se trataron por 72 h con diferentes combinaciones Sfb/Camb, Sfb/Ex, o con las drogas individuales y se obtuvieron las curvas dosis respuesta (viabilidad: 2D: MTT; 3D: fosfatasa ácida). Se determinaron la concentración inhibitoria del 50% del crecimiento (IC50) de cada droga y los índices de combinación (IC: <1 sinergia, =1 adición, >1 antagonismo) y de reducción de dosis (cuántas veces se puede reducir la dosis de una droga en una combinación para producir el mismo efecto que la droga sola) (CompuSyn). Se calculó el volumen de los esferoides (0 y 72 h) como medida del crecimiento celular (ImageJ). Las drogas individuales redujeron la viabilidad celular de forma dosis dependiente y el cultivo 3D fue menos sensible a las drogas que el 2D: IC50 2D (μM): Sfb 2, Camb 65, Ex 35; IC50 3D (μM): Sfb 10*, Camb 122*, Ex 100* (*p<0,05 3D vs 2D). Diferentes combinaciones de Sfb con Camb y Ex (dosis en el rango del IC50 de cada droga) actuaron sinérgicamente (IC<1), incrementando la sensibilidad a Sfb solo y permitiendo reducciones de dosis de hasta 4 veces para Sfb. En cultivos 3D, Sfb retrasó el crecimiento de los esferoides y este efecto se exacerbó en los tratamientos combinados:% volumen 72 vs 0 h: control: 440, Sfb7,5μM: 172*, Sfb7,5μM/Camb100μM: 133*#, Sfb7,5μM/Ex75μM: 136*# (*p<0,05 vs control, #p<0,05 vs Sfb). Conclusión: los inhibidores de SIRT1 potenciaron el efecto citotóxico de Sfb. Esto permitiría aumentar su eficacia y reducir su dosis. El modelo 3D resultó más resistente al tratamiento, validando su utilidad para estudios de resistencia y testeo de drogas.

470 (459) ESTUDIO DEL EFECTO DEL EXTRACTO DE YERBA MATE (ILEX PARAGUARIENSIS) EN EL CRECIMIENTO Y LA PROGRESIÓN TUMORAL

Rocio Soledad Garcia Lazaro; Maríano Rolando Gabri; Daniel Eduardo Gómez; Daniel Fernando Alonso; Hernan Gabriel Farina
Laboratorio de Oncologia Molecular – UNQ

La Yerba Mate (Ilex paraguariensis St. Hilaire) es una planta originaria de la región subtropical de América del Sur, posee compuestos polifenólicos que podrían tener un efecto modulador del comportamiento de las células tumorales. Existen pocos reportes sobre el efecto directo de estos compuestos en modelos de crecimiento y progresión tumoral. En este trabajo se muestran las propiedades de un extracto de yerba mate en modelos tumorales in vitro de mama (MDA-MB 231) y colon (CT26). Los datos preliminares encontrados indican que dicho extracto tiene una actividad anti proliferativa, anti adhesiva y anti migratoria. Los ensayos realizados para definir la capacidad antiproliferativa, indicaron dosis inhibitorias del cincuenta por ciento de crecimiento (IC_{50}) de 0.7 mM para la línea celular de colon y de 2 mM para la línea celular de mama. Con estos resultados se establecieron las dosis exploratorias para evaluar los eventos de adhesión y migración *in vitro*.Se encontró que el extracto de yerba mate disminuyó la adhesión en las dos líneas celulares estudiadas, mostrando un descenso significativo del 40% respecto al control en la línea CT26 (*** p< 0.001 ANOVA test-) y de un 70% en la línea MDA-MB 231(*** p< 0.001 ANOVA test). Respecto a la migración celular, el extracto de yerba mate redujo la movilidad de ambas líneas tumorales en porcentajes similares a los encontrados en el ensayo de adhesión (70% MDA-MB 231 y 60% para CT26; * p<0.5, ANOVA test).Los resultados preliminares encontrados sugieren un efecto anti invasivo del extracto de yerba mate generado sobre las células tumorales de mama y colon estudiadas.

471 (462) EL TRANSPORTE DE CATEPSINA D EN CÉLULAS TUMORALES PODRÍA SER MEDIADO POR RECEPTORES

Nadia Bannoud[12]; Flavia Lorena Carvelli[1]; Laura María Vargas Roig[23]; Miguel Angel Sosa Escudero[12]
IHEM[1] Facultad de Ciencias Médicas Universidad Nacional de Cuyo[2] IMBECU[3]

La secreción aberrante de hidrolasas lisosomales, tal como procatepsina D (proCatD), es un cambio fenotípico común en muchos cánceres humanos que favorece la invasión y metástasis tumoral. El transporte de la enzima a lisosomas es mediado por receptores a manosa-6-P (MPRs), sortilina o vías alternativas. Se han descripto dos formas de MPRs: catión-dependiente (CD-MPR) y catión-independiente, de los cuales el CD-MPR participaría en la exocitosis de enzimas lisosomales. En células de tumores mamarios malignos se desconoce aún el mecanismo de secreción de proCatD al medio extracelular. Algunos autores lo atribuyen a un defecto en la acidificación de compartimientos. En base a esta hipótesis, estudiamos el efecto del cloruro de amonio (amina acidotrópica que impide la acidificación de compartimientos intracelulares), sobre la expresión y distribución de los receptores

que podrían estar involucrados en el transporte intracelular de la enzima en la línea celular MCF-7 (derivada de adenocarcinoma ductal mamario, que expresa receptores a estrógeno). Mediante inmunoblot e inmunofluorescencia indirecta, observamos que el tratamiento con cloruro de amonio durante 6, 12, 18 y 24h aumentó la expresión de la forma inmadura de catepsina D en células MCF-7, indicando que la misma no es procesada en lisosomas. A su vez, la amina indujo un aumento en la expresión del CD-MPR y una disminución de sortilina. El primer efecto podría atribuirse a un bloqueo en el reciclaje del receptor desde un compartimiento acídico al aparato de Golgi, mientras que el segundo efecto podría deberse a que la neutralización de los compartimientos indujo la secreción de exosomas y consecuentemente la liberación de sortilina al medio extracelular, tal como lo han propuesto otros autores. Estos resultados sugieren que: el transporte intracelular de proCatD es mediado por receptores, y que su secreción no se debe a un defecto en la acidificación de compartimientos en células MCF-7.

472 (468) COOPERACIÓN ESPECÍFICA ENTRE MAGEA6 Y MA- GEA11 Y SU RELEVANCIA EN LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS (AR)

Julieta Laiseca; Mara Ftima Ladelfa; Carolina Bret; Martn Monte
Laboratorio de Oncología Molecular, Departamento de Química Biológica e IQUIBICEN (UBA-CONICET), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Las proteínas de la subfamilia Mage-A (Melanoma Antigen GEnes) poseen expresión específica tumoral y una alta homología de secuencia, sin embargo regulan la proliferación y la sobrevida de las células tumorales por distintas vías. El Receptor de Andrógenos (AR) media el crecimiento estimulado por hormonas y su desregulación contribuye al desarrollo del cáncer de próstata. MageA11 es un corregulador de AR que aumenta su actividad transcripcional. Nosotros hemos reportado que en sobreexpresión, MageA6 es capaz de colaborar con MageA11 en el aumento de la actividad transcripcional AR debido, al menos en parte, a la estabilización que genera la unión de MageA6 con MageA11 (SAIC 2013). En este trabajo pudimos comprobar que la unión entre MageA6 y MageA11 inhibe la poliubiquitinación de MageA11 y su degradación ya que al inhibir el proteosoma con MG132 se anula el efecto estabilizador. Por otro lado, analizamos el efecto de MageA6 en un sistema endógeno AR/MageA11 en líneas celulares de cáncer de próstata (LNCaP, 22RV1 y C42B) que expresan tanto AR como MageA11 y observamos nuevamente el aumento significativo en la actividad transcripcional de AR con el agregado de MageA6 en experimentos de genes reporteros (dos veces en LNCaP, tres veces en C42B y doce veces en 22RV1). Por último, para analizar la interacción a nivel endógeno entre MageA6 y MageA11, produjimos un anticuerpo específico contra MageA11 que reconoce la región N-terminal presente solo en este. Observamos que reconoce a MageA11 y no a MageA1, A2, A6 ni B2; además se pudo observar la expresión de MageA11 en líneas celulares tumorales (LNCaP, C42B, PC3, DU145, HCT116 y U2OS) siendo mayor la expresión en PC3, C42B y U2OS. Experimentos futuros nos permitirán analizar si existe interacción entre MageA11 y MageA6 a nivel endógeno, corroborando la importancia de esta cooperación en la vía ya que la colaboración entre MageA11 y MageA6 podría dar ventajas en procesos asociados al desarrollo tumoral.

473 (487) EL TRATAMIENTO COMBINADO CON 17-β ESTRADIOL Y PROGESTERONA REDUCE LA PROLIFERACIÓN EN TUMORES DE COLON DE RATAS OVARIECTOMIZADAS

Corina Verónica Sasso[1]; Flavia Eliana Santiano[1]; Leila Ester Zyla[1]; Silvana Noemí Semino[2]; Virginia Pistone Creydt[1]; Constanza Matilde López Fontana[1];Rubén Walter Carón[1]
Laboratorio de Hormonas y Biología del Cáncer, IMBECU, CONICET, CCT-Mendoza[1] Anatomía Patológica, Hospital Universitario, Universidad Nacional de Cuyo[2]

Estudios epidemiológicos sugieren que la terapia de reemplazo hormonal con análogos sintéticos de los esteroides ováricos en mujeres menopáusicas disminuye el riesgo de cáncer de colon (CaCo), pero los mecanismos involucrados recién están empezando a ser dilucidados. En este trabajo estudiamos el efecto de los esteroides ováricos fisiológicos 17-β estradiol (E2) y progesterona (P4) en un modelo animal de CaCo. Utilizamos ratas Sprague Dawley tratadas con 20 dosis de Dimetilhidracina (21 mg/kg, s.c. semanal). En el día 30 posterior a la primer dosis fueron ovariectomizadas, y en el día 37 se inició la terapia de reemplazo hormonal con inyecciones s.c. de E2 (60 µg/kg), P4 (10 mg/kg), E2+P4 o vehículo. Los resultados fueron analizados mediante ANOVA I con GraphPad Prism. Los niveles séricos de E2 y P4 alcanzaron valores normales y los tumores fueron clasificados como adenocarcinomas. El tratamiento con E2 redujo un 29% la incidencia, disminuyó la multiplicidad y aumentó el número de figuras mitóticas tumorales ($p<0.05$). El tratamiento combinado de E2+P4 produjo una incidencia del 100%, pero estos tumores presentaron un aumento de figuras apoptóticas, una mayor expresión de caspasa 3 y PARP, y una disminución de PCNA ($p<0.05$). Los tumores del grupo E2 presentaron un aumento de la expresión del receptor de estrógeno alfa (REα, $p<0.01$), mientras que el tratamiento combinado aumentó la expresión del receptor de estrógeno beta (REβ, $p<0.01$). En conclusión, en nuestro modelo experimental el tratamiento con E2 previene la aparición de tumores de colon. Sin embargo, los que alcanzan a desarrollarse poseen una mayor proliferación, que puede ser debida a la pérdida de expresión del REβ y al aumento del REα. Por otro lado, el tratamiento con E2+P4 no previene el desarrollo tumoral, aunque sí conduce a una reducción en la proliferación y a un aumento de la apoptosis una vez que los tumores se han desarrollado, siendo este efecto debido probablemente a la menor relación REα/β.

474 (491) REGULACIÓN DINÁMICA DE LA EXPRESIÓN DE CLCA2 POR FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA

Juliana Porretti[1]; Cintia Masillo[1]; Nicolas Dalton[1]; Cristian Moiola[2]; Paola De Luca[1]; Adriana De Siervi[1]
Laboratorio de Oncología Molecular y Nuevos Blancos Terapéuticos - IBYME[1] IBYME[2]

Varias evidencias asocian un incremento de la incidencia y la agresividad del cáncer de próstata (PCa) en pacientes con síndrome metabólico (SM). Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que en un modelo murino de SM el silenciamiento estable del corregulador transcripcional CtBP1 disminuyó el crecimiento de tumores xenotransplantados. Un análisis de la expresión génica de esos tumores utilizando microarreglos de expresión identificó que CtBP1 reprime la expresión de CLCA2, un gen supresor de cáncer de mama. Asimismo, CtBP1 disminuyó la actividad del promotor de CLCA2 en líneas de PCa. En este trabajo estudiamos la regulación transcripcional de CLCA2 en PCa. Por inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) establecimos que CtBP1 se asocia al promotor de CLCA2. Cuando cotransfectamos células PC3 con CtBP1 y el plásmido reportero del promotor de CLCA2 en conjunto con un panel de factores de transcripción, encontramos que p53 y ETS2 inducen significativamente la actividad del promotor en forma independiente de CtBP1; sin embargo, E2F1 y STAT3 no afectaron dicha actividad. Sorprendentemente, el gen supresor tumoral BRCA1 disminuyó drásticamente la actividad transcripcional de CLCA2 y esta represión fue significativamente mayor en presencia de CtBP1. Más aún, el silenciamiento estable de BRCA1 en células PC3 eliminó la represión transcripcional de CLCA2 por CtBP1. Debido a que ETS2, p53 y BRCA1 son factores que intervienen en la modulación del ciclo celular, determinamos la distribución de células en las distintas fases del ciclo por tinción con ioduro de propidio y análisis por citometría de flujo. La sobreexpresión de CLCA2 produjo el arresto de células PC3 en fase G0/G1. Nuestros resultados describen por primera vez que CLCA2 es finamente regulado en el PCa por una combinación de factores transcripcionales. Asimismo, muestran un nuevo rol de esta proteína como reguladora del ciclo celular en esta enfermedad.

475 (493) COMPLEJA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE AROMATASA POR CTBP1, BRCA1 Y P300 EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA.

Cintia Massillo[1]; Juliana Porretti[1]; Nicolás Dalton[1]; Cristian Moiola[2]; Paola De Luca[1]; Adriana De Siervi[1]
Laboratorio de Oncología Molecular y Nuevos Blancos Terapéuticos- IByME- CONICET[1] IByME[2]

El cáncer de próstata (PCa) continúa siendo uno de los problemas más importantes de la salud pública. Los co-reguladores transcripcionales juegan un papel esencial en la homeostasis celular y frecuentemente están alterados en el cáncer. C-terminal Binding Protein (CtBP1) es un co-represor de la transcripción de genes supresores tumorales. Previamente utilizando microarreglos de expresión de mRNA a partir de xenotransplantes obtenidos por inyección de células tumorales de próstata PC3 que tienen silenciada la expresión de CtBP1 o células control, encontramos que CtBP1 reprime la expresión de CYP19A1 (aromatasa), una enzima que participa en la síntesis de estradiol por la aromatización de la testosterona. El objetivo de este trabajo fue determinar el mecanismo de regulación transcripcional de CYP19A1 mediado por CtBP1 en el PCa. Para ello cotransfectamos células PC3 con el plásmido de expresión de CtBP1 y un panel de 10 vectores reporteros que contienen clonado río arriba del gen de la luciferasa diferentes longitudes (27 a 1004 pb) del promotor de CYP19A1. CtBP1 reprime significativamente la actividad de todos los promotores estudiados. Mediante inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) y RT-qPCR determinamos que CtBP1 se asocia al promotor de CYP19A1 y reprime su transcripción en células PC3. Para identificar los co-reguladores que actúan junto con CtBP1 en la modulación de la expresión de CYP19A1, investigamos a p300 (histona acetil-transferasa) y a BRCA1 (gen supresor tumoral). Encontramos que BRCA1 y p300 se asocian al promotor de CYP19A1 y reprimen su transcripción, y esa represión es significativamente mayor en presencia de CtBP1. Utilizando células PC3 que tienen disminuida en forma estable la expresión de BRCA1 determinamos que la represión de aromatasa por CtBP1 se pierde en ausencia de BRCA1. Estos hallazgos manifiestan por primera vez el modo de regulación de la transcripción de CYP19A1 por factores cruciales en el control supervivencia/muerte en el PCa.

476 (503) EFECTO AUTOCRINO DE LA PROLACTINA EN LA VIABILIDAD DE CELULAS DE GLIOBLASTOMA

Antonela Asad[1]; Mariela Alejandra Moreno Ayala[1]; María Florencia Gottardo[1]; María Andrea Camilleti[2]; Erika Faraoni[2]; María Graciela Castro[3]; Victor Goffin[4]; Adriana Seilicovich[1]; Daniel Alberto Pisera[1]; Jimena Ferraris[1]; Maríanela Candolfi[1]
INBIOMED (UBA-CONICET)[1] IByME (CONICET)[2] University of Michigan School of Medicine, MI, USA[3] Faculte de Medecine Paris Decartes, Paris, Francia[4]

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor cerebral primario más agresivo y frecuente. Dado que los tratamientos de rutina no logran prolongar la supervivencia a largo plazo de los pacientes, se necesitan nuevos enfoques terapéuticos que inhiban la proliferación o estimulen la apoptosis de las células tumorales. Recientemente, la prolactina (PRL) ha sido asociada al desarrollo de diversos tipos de cáncer. A pesar de que la expresión de PRL ha sido reportada en especímenes de GBM humano, el papel de esta hormona en la patogenia de esta enfermedad es aún desconocido. Nuestro objetivo fue evaluar la expresión y función de la PRL en células de GBM humano (U87), murino (GL26) y de rata (C6). Observamos expresión de PRL en las células de GBM mediante inmunofluorescencia. Además, detectamos PRL en el sobrenadante de las células de rata (6-20 ng/ml) y de ratón (40-90 ng/ml) mediante radioinmunoensayo. Dado que ha sido reportado que la PRL puede tener efectos mitogénicos y antiapoptóticos, evaluamos el efecto de la PRL sobre la viabilidad de células de GBM. Mediante la técnica de MTT observamos que la incubación con PRL recombinante (100 ng/ml) por 48 hs aumentó la viabilidad de células de GBM humano (C=0.2±0.01 UA; PRL=0.26±0.02, $p<0.05$). Para evaluar el papel de la PRL endógena en la supervivencia de las células de GBM, utilizamos el antagonista del receptor de PRL Δ1–9-G129R-hPRL [Del 1-9, 5µg/ml (Endocr Rev 2005 p.400)]. La incubación con Del1-9 por 48 hs en ausencia de suero redujo la viabilidad de células de GBM humano o de ratón (U87: C=0.14±0.01 UA, Del1-9=0.12±0.01; $p<0.05$; GL26: C=0.04±0.01 UA, Del1-9=0.006±0.002; $p<0.05$). Nuestros resultados indican que las células de GBM expresan PRL y la secretan de forma constitutiva. Es probable que la PRL producida localmente module la supervivencia de las células tumorales, constituyendo un potencial blanco terapéutico para el tratamiento del GBM.

477 (507) CTBP1 MODIFICA LA ADHESIÓN Y LA MORFOLOGÍA CELULAR AFECTANDO EL POTENCIAL INVASIVO DE TUMORES DE PRÓSTATA EN UN MODELO DE SÍNDROME METABÓLICO

Nicolás Dalton[1]; Cintia Massillo[1]; Juliana Porretti[1]; Georgina Scalise[1]; Alejandra Paez[2]; Geraldine Gueron[2]; Cristian Moiola[3]; Paola De Luca[1]; Adriana De Siervi[1]
Laboratorio de oncologia molecular y nuevos blancos terapéuticos, IByME-CONICET[1] Laboratorio de inflamación y cáncer, IQUIBICEN-CONICET[2] IByME[3]

El síndrome metabólico (SM) aumenta el riesgo de desarrollar cáncer. C-terminal binding protein (CtBP1), un correpresor transcripcional, es considerado un sensor del estado metabólico celular ya que es activado por NADH. En nuestro laboratorio, previamente alimentamos ratones nude con una dieta rica en grasas (DG) la cual produjo un aumento del NADH e indujo un estado similar al SM. En estos animales desarrollamos xenotransplantes a partir de células tumorales de próstata con expresión diferencial de CtBP1, a los cuales estudiamos empleando microarreglos de expresión. Los resultados mostraron a la adhesión celular como una de las vías reguladas por CtBP1. Más aún, la sobreexpresión de CtBP1 disminuyó la capacidad de las células PC3 para adherirse a una matriz de colágeno. En este trabajo investigamos la asociación de CtBP1 al promotor de ITGB4, uno de los genes reprimidos por CtBP1 en los xenotransplantes. Mediante inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) encontramos que CtBP1 se une al promotor proximal de ITGB4 en la línea tumoral PC3. Dada la participación de esta proteína en la adhesión célula-matriz extracelular, evaluamos mediante microscopia confocal, el efecto de CtBP1 sobre la proporción de membrana plasmática adherida a sustrato. El silenciamiento de CtBP1 aumentó la proporción de membrana en contacto con el sustrato. La sobreexpresión de CtBP1 aumentó el número de filopodios, proyecciones delgadas formadas por filamentos de actina característicos del proceso de migración celular. La sobreexpresión de CtBP1 correlacionó con un fenotipo celular mesenquimal evidenciado por un aumento de la relación Vimentina/E-caderina. Cabe aclarar que E-caderina es un marcador epitelial que es reprimido por CtBP1 y Vimentina es un marcador mesenquimal. Estos resultados expanden el rol antes descripto de CtBP1 en el proceso de adhesión celular y lo involucran en las etapas tempranas del proceso de transición epitelio-mesenquimal en cáncer de próstata en el contexto de SM.

478 (521) TRATAMIENTO DE CÉLULAS DE CÁNCER DE PULMÓN CON EL PÉPTIDO SINTÉTICO CIGB-300: IMPLICAN- CIAS DE LA INHIBICIÓN DE LA VÍA NF-κB

Stéfano Cirigliano[1]; María Inés Díaz Bessone[1]; Carolina Flumian[1]; Damián Berardi[1]; Silvio Perea[2]; Elisa Bal De Kier Joffé[1]; Hernán Farina[3]; Laura Todaro[1]; Alejandro Urtreger[1]
Inst. de Oncologia Dr. Angel Roffo[1] Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana Cuba.[2] Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes[3]

La proteína quinasa CK2 es una Ser/Thr quinasa involucrada en crecimiento, supervivencia y apoptosis. CIGB-300 es un péptido sintético capaz de unirse al dominio fosfoaceptor de varios sustratos de CK2 inhibiendo su actividad.CIGB-300 ha demostrado actividad antitumoral y este efecto estaría mediado en parte por la inhibición de la vía de supervivencia de NF-kB, según pudimos constatar en un modelo in vitro de células de cáncer de pulmón (NCI-H125). Se sabe además que dicha vía de señalización se

encuentra asociada a quimiorresistencia.Respecto a la vía de NF-kB, observamos con antelación por WB que tratamientos cortos con CIGB-300 redujeron los niveles nucleares de la subunidad p65, necesaria para la señalización de esta vía, aún en presencia del activador PMA. Por el contrario, el tratamiento con cisplatino indujo la acumulación de p65 en el núcleo. Al tratar las células con la combinación de cisplatino y CIGB-300 pudimos determinar que la traslocación de p65 al núcleo fue inhibida, indicando que el efecto de CIGB-300 prevalece por sobre el del cisplatino.Con el fin de indagar acerca de la implicancia terapéutica de la inhibición de la vía de NF-kB, indujimos quimiorresistencia al cisplatino en células de cáncer de pulmón A549. Luego de tratar periódicamente dicha línea durante seis meses, se corroboró que la viabilidad de estas células luego del tratamiento con cisplatino (5uM, 72h) fue un 40% mayor respecto a las células de la línea control. Notablemente, la IC50 de CIGB-300 obtenida en las células resistentes a cisplatino fue significativamente más baja (19,0% menos que la línea control, p<0,05; Test-T), sugiriendo que ambos tratamientos podrían estar afectando mecanismos en común.La inhibición de la vía de NF-kB observada, aún en presencia de cisplatino, nos conduce a profundizar en el mecanismo de acción en un esquema de quimiorresistencia y permite el acercamiento a un abordaje como segunda línea de tratamiento para cáncer de pulmón.

479 (524) EFECTOS PARADÓJICOS ANTE LA MODULACIÓN DE LA QUINASA P38 EN CÉLULAS TUMORALES DE MAMA

Carla Sabrina Capobianco[1]; Julio Aguirre-Ghiso[2]; Daniel Eduardo Gómez[1]; Daniel Fernando Alonso[1]; Hernan Gabriel Farina[1]
Laboratorio de Oncología Molecular. UNIV.NAC.DE QUILMES[1] Tisch Cancer Institute at Mount Sinai. Mount Sinai School of Medicine[2]

El rol de p38 en el desarrollo del cáncer es actualmente un tema con visiones encontradas. Por un lado, es central en el mantenimiento de la quiescencia, un fenómeno reversible que se observa en algunos tipos tumorales, mediante el cual las células se encuentran arrestadas en el crecimiento. Este es el motivo por el cual en varios tipos de cáncer se observan recaídas luego de largos períodos libres de enfermedad. Sin embargo, existen reportes que le asignan a p38 un rol clave en la supervivencia de las células tumorales, por lo que se llegó a considerar a esta proteína un blanco interesante en la terapia antitumoral. En este trabajo se intenta definir qué rol cumple p38 en diferentes aspectos de la biología tumoral. Se encontró que la inhibición de su actividad provoca *in vitro* un aumento en la actividad de ERK, en la expresión de integrinas 5 en membrana, y en la adhesión. De forma previa, *in vivo* se demostró que la inhibición provoca un descenso en la latencia de tumores sc y un aumento en el número de metástasis pulmonares y en el tamaño de las recidivas locales. Asimismo, la inhibición de p38 *in vitro* provocó un descenso en el número de colonias formadas en un ensayo clonogénico y una reducción en la viabilidad a 72 h. Estos resultados demuestran que de acuerdo al entorno en el cual se estudie a p38 las respuestas pueden ser variadas. Sin embargo, si se analiza en profundidad se pueden definir dos escenarios opuestos: por un lado células que se encuentran adaptándose a un nuevo entorno y entablando los primeros pasos en el crecimiento y por el otro células ya establecidas. En el primer caso, p38 se encontraría regulando negativamente el crecimiento, con lo cual al ser inhibida se obtienen resultados a favor de la proliferación activa, y en el segundo caso, sería clave para la supervivencia. Tomando en cuenta los resultados paradójicos que se obtuvieron resulta claro que es necesario ahondar los estudios, prestando particular atención a los modelos utilizados.

MEDICINA REGENERATIVA Y TERAPIA CELULAR 2

480 (126) ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES PROLIFERATIVAS DE LAS HAECS DURANTE SU DIFERENCIACIÓN HEPÁTICA

Rodrigo Riedel[1]; Antonio Pérez Pérez[2]; Bernardo Maskin[3]; Maríana Jaime[3]; Ornella Parolini[4]; Víctor Sánchez-Margalet[2]; Cecilia L. Varone[1]; Julieta Maymó[1]
IQUIBICEN[1] Depto. de Bioquímica Médica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla, Sevilla, España[2] Hospital Nacional Alejandro Posadas, Buenos Aires, Argentina[3] Centro di Ricerca E. Menni- Fondazione Poliambulanza-Istituto Ospedaliero, Brescia, Italia.[4]

La placenta y las membranas fetales representan una importante fuente de células madre para la medicina regenerativa. Las células placentarias poseen ventajas respecto a otras células madre: el fácil acceso a los tejidos, el potencial ilimitado para proveer células y su uso no genera debates éticos. Las células madre amnióticas epiteliales (hAECs) son aisladas del amnios de la placenta humana a término. Expresan marcadores embrionarios y pueden diferenciar a las tres capas germinales. No son tumorigénicas y poseen propiedades inmunomoduladoras. Así, las hAECs se posicionan como ideales candidatas para la medicina regenerativa. La falla hepática es una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en el mundo; sin embargo, existen obstáculos respecto a su tratamiento. Las hAECs han sido propuestas como fuente alternativa de hepatocitos, dado su capacidad de diferenciación hepática. El objetivo del presente trabajo fue estudiar algunos aspectos de la proliferación de las hAECs, durante su diferenciación hepática temprana y tardía. Se analizó asimismo la expresión de marcadores de pluripotencia (Sox-2, Oct-4, Nanog) y hepáticos (α-fetoproteína, α1-AT, albúmina, CYP3A4, CYP7A1). La diferenciación se llevo a cabo durante 30 días con factores específicos (EGF + dexametasona) o con medio condicionado de la línea celular hepática HepG2 (MC). Se observó por *q*RT-PCR, una disminución en la expresión de los genes de pluripotencia y un incremento de los genes hepáticos. Se observó un aumento en la expresión de albúmina y de CYP3A4, evaluado por Western blot e inmunofluorescencia (IF). Se determinó que el EGF incrementó significativamente la proliferación y la viabilidad de las hAECs y el MC las disminuyó, medidas por incorporación de ^{3}H-T y con MTT, respectivamente. Se produjo un aumento en la expresión de Ki-67, determinada por IF. Los resultados obtenidos contribuyen a la comprensión de los mecanismos celulares y moleculares que ocurren durante la diferenciación hepática de las hAECs.

481 (135) ACTIVIDAD DE RETROTRANSPOSONES LINE-1 EN LA DIFERENCIACIÓN NEURAL. EFECTOS DE DESACETILASAS DE HISTONAS Y DNA METIL-TRANSFERASAS

Lucía Rey Álvarez; Maríana Salcedo; Andres Javier Orqueda
Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental, Instituto Universitario del Hospital Italiano

Los retrotransposones *Long interspersed nuclear elements-1* (LINE-1) son elementos repetitivos que contienen dos marcos abiertos de lectura: ORF1 codifica una proteína de unión a RNA, y ORF2 codifica una retrotranscriptasa. La retrotransposición de estos elementos involucra un intermediario de RNA y tiene lugar durante el desarrollo embrionario temprano, en células germinales, células *stem* embrionarias y progenitores neurales del hipocampo; en células somáticas del cerebro, las inserciones en nuevos sitios del genoma conducirían al mosaicismo. Sin embargo, los mecanismos de control de la actividad de dichas secuencias no se conocen completamente. Los objetivos de este trabajo fueron determinar si la actividad de los elementos LINE-1 se ve alterada cuando células madre derivadas de tejido adiposo (hASC) o células de neuroblastomas humano (SH-SY5Y) y murino (N2A) son diferenciadas a células del tipo neural con ácido retinoico (RA), y evaluar la participación de desacetilasas de histonas (HDAC) y metil-transferasas de DNA (DNMT). En primer lugar, encontramos que el contenido relativo de DNA del ORF2 aumenta en células SH-SY5Y y hASC tratadas con RA, sugiriendo que nuevas inserciones de elementos LINE-1 ocurren durante la diferenciación neural. La inhibición de HDAC con tricostatina A (TSA) condujo a niveles aún superiores del

contenido de ORF2 en células SH-SY5Y diferenciadas con RA, mientras que la inhibición de DNMT con 5-azacitidina (5AZA) no tuvo efectos sobre la TSA. Al analizar los niveles de RNA observamos, por un lado, que los LINE-1 se inducen en los tres tipos celulares tratados con RA; por otro, TSA incrementa los niveles de RNA en células SH-SY5Y sometidas o no a RA respecto a los controles sin tratar, mientras que TSA junto a 5AZA lo hacen en hASC y células N2A, diferenciadas con RA o no. Estos resultados sugieren que la retrotransposición de LINE-1 aumenta durante la diferenciación neural, y depende de los niveles globales de acetilación de histonas.

482 (149) CARACTERIZACIÓN DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LAS ISOFORMAS DE NSL2: POSIBLE MODULACIÓN DIFERENCIAL SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA MOF

Lucia Canedo[1]; Fiorella Belforte[1]; Nazarena Ferreyra Solari[1]; Ken Kobayashi[2]; Carolina Perez Castro[1]
Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires (IBioBA) - CONICET- Partner Institute of the Max Planck Society. Buenos Aires, Argentina[1] Laboratorio de Agrobiotecnología, Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular, Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental Aplicada (IBBEA-CONICET-UBA)[2]

El complejo epigenético NSL regula la expresión de genes críticos para el mantenimiento de funciones celulares básicas y el sostenimiento del estado pluripotente. Desregulaciones, tanto en los niveles de expresión como de localización subcelular de sus componentes contribuyen, en teoría, en el desencadenamiento de enfermedades como el cáncer. Anteriormente, reportamos que un componente del complejo, la proteína NSL2, se expresa en células pluripotentes y durante la diferenciación embrionaria. Asimismo, encontramos que NSL2 regula la expresión de genes maestros del desarrollo. Existen dos isoformas murinas de NSL2 (NSL2-corta y NSL2-larga), cuyos cDNAs fueron clonados y expresados en células de mamífero y comprobamos que poseen una localización subnuclear diferencial. Reportamos ahora que la isoforma larga (NSL2-L) es la más abundante en células pluripotentes y que, a diferencia de NSL2-corta (NSL2-C), se localiza en focos subnucleares de diferente morfología y distribución. Mediante ensayos de Inmunofluorescencia y co-transfección con distintos marcadores de estructuras nucleares, encontramos que los focos de NSL2-L localizan mayoritariamente en los nucléolos. Sin embargo, la co-transfección con marcadores de fase S, la proteína Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), muestra que NSL2-L se encuentra excluída del nucléolo durante dicha fase, sugiriendo una localización diferencial a lo largo del ciclo. Interesantemente, encontramos que NSL2-L, es capaz de relocalizar a MOF (acetiltransferasa del complejo NSL), de manera específica, hacia estos focos nucleolares posiblemente regulando de esta manera su función. Nuestros resultados indicarían que la isoforma NSL2-L es un potencial regulador in vivo de las funciones de MOF. Apoyado por ANPCyT y FOCEM (COF 03/11)

483 (198) EFECTO DE LA ISQUEMIA EN EL AISLAMIENTO DE ISLOTES PANCREÁTICOS PORCINOS Y DE PACIENTES PARCIALMENTE PANCREATECTOMIZADOS

Cecilia A Rufolo[1]; Maríana Barbich[1]; Marcelo Ielpi[1]; Monica Loresi[1]; Martin De Santibañes[3]; Sung Ho Hyon[3]; Luis Grosembacher[2]; Federico Pereyra Bonnet[1]
ICBME, Instituto Universitario del Hospital Italiano[1] Servicio de Endocrinología y Medicina Nuclear del Hospital Italiano[2] Servicio de Cirugía General, Hospital Italiano de Buenos Aires[3]

El trasplante de islotes pancreáticos es una terapia celular que se utiliza como alternativa en el tratamiento de la diabetes insulinodependiente. El objetivo de este trabajo fue observar el efecto de diferentes tiempos de isquemia pancreática en el aislamiento de islotes a distintas concentraciones y tiempos de digestión enzimática. Para ello, 24 muestras de páncreas porcino (6,24gr+/-0,18) provenientes de un matadero local fueron conservadas en solución de preservación de Wisconsin a 4°C y procesadas en grupos a las 3 (n=12) y 24 hs (n=12) post faena (G3 y G24 respectivamente). Posteriormente, G3 y G24 fueron tratados con distintas concentraciones de enzima de digestión [Colagenasa tipo V; 0 (control), 5 y 50 mg/gr de tejido] y observados bajo lupa a los 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min de digestión en baño a 37°C (4 réplicas c/u). Para detectar la eficiencia de la obtención de islotes se consideró como parámetro la aparición de islotes sueltos, con morfología conservada y contenido de insulina evidenciada por tinción con ditizona. En G3, se observaron los primeros islotes sueltos a los 10 min de digestión en el 50% de las muestras y a los 15 min en el 100% de las muestras, independientemente de la concentración de enzima. Asimismo a partir de los 20 min se observó sobre-digestión en las muestras. Por otro lado, en el G24 tanto para 5 y 50 mg enzima/gr tejido, se observaron islotes sueltos a partir de los 5 min en el 100% de las muestras, seguido por la misma dinámica de sobre-digestión. En los controles sin enzima en G3 no se observaron islotes sueltos, mientras que en G24 observamos islotes sueltos desde los 5 min de incubación. Por último, se procesó una muestra de páncreas humano (0,5 gr) con 3 hs de isquemia y se hallaron islotes sueltos desde los 15 min con ambas concentraciones de enzima. Nuestros resultados evidencian que el tiempo de isquemia condiciona la concentración y el tiempo óptimo de digestión enzimática en el aislamiento de islotes pancreáticos.

484 (224) OCT4 MEDIA LA DIFERENCIACIÓN HACIA ADIPOCITOS Y OSTEOCITOS DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Diego Mario Santa Cruz; Natalia Alejandra Pacienza; Gustavo Gabriel Yannarelli
Universidad Favaloro

Las células madre mesenquimales (MSCs) son células multipotentes. Sin embargo, los mecanismos que median dicha multipotencialidad no han sido dilucidados. Más aún, la presencia de variantes inactivas y pseudogenes del factor de pluripotencialidad OCT4 hacen controversial su presencia en MSCs. Por lo tanto, en el presente estudio investigamos la expresión de OCT4 en MSCs y su relación con la multipotencialidad de estas células. Las MSCs se aislaron de medula ósea (BM) de ratones Balb/c. Se silenció (siRNA) el factor OCT4 (siOCT4) y se determinó la eficiencia de diferenciación hacia osteocitos y adipocitos en comparación con células control (siNull). Las BM-MSCs expresaron una variante de OCT4 de localización nuclear y, por lo tanto, activa. El silenciamiento de OCT4 no solo llevo a una reducción significativa de su expresión (67%, $p<0,0001$) sino que además disminuyó la expresión de otros dos factores de pluripotencialidad, Nanog y SOX2 (85% y 72% respectivamente, $p<0,0001$). 15 días post-inducción de la diferenciación para adipocitos, se observó una marcada disminución de células con inclusiones lipídicas (Oil Red O positivas) en el grupo siOCT4 vs. siNull. La cuantificación demostró una reducción de la diferenciación de 3,04 veces ($p<0,001$). La diferenciación hacia osteocitos se evaluó a los 20 días post-inducción mediante tinción de depósitos de Ca en la matriz extracelular. El grupo siOCT4 mostró una menor capacidad de diferenciación respecto del grupo siNull, reflejada por una significativa disminución del contenido de calcio (2,41 veces, $p<0,0001$) y de la actividad del marcador osteogénico fosfatasa alcalina (0,25 vs. 0,43 $nmol.min^{-1}.ug\ prot^{-1}$, $p<0,001$). En conclusión, nuestros datos infieren que las MSCs expresan una variante activa del factor OCT4 que controlaría la red de factores de pluripotencialidad, mediaría la diferenciación de las MSCs hacia adipocitos y osteocitos y sugerirían un mecanismo de regulación de la multipotencialidad de estas células.

485 (234) EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROANGIOGÉNICA DE LOS PRODUCTOS IÓNICOS DE DISOLUCIÓN DE UN VIDRIO BIOACTIVO DOPADO CON LITIO

Luis Alberto Haro Durand[12]; Gabriela Vargas[3]; Rosa Vera Mesones[3]; Alejandra Fanovich[4]; Alberto Baldi[2]; Alejandro Gorustovich[1]
Grupo Interdisciplinario de Materiales-IESIING-UCASAL[1] Laboratorio de Patología y Farmacología Experimental-

IBYME[2] Cátedra de Biología del Desarrollo-Facultad Dde Ciencias Naturales-Unsa[3] División Cerámicos-Intema[4]

Una de las principales limitaciones en medicina regenerativa de tejidos vascularizados es la dificultad de lograr una rápida neo-vascularización necesaria para el intercambio de oxígeno, nutrientes, factores de crecimiento y células que participan en el proceso de regeneración y/o reparación tisular. Considerando que el litio (Li) estimula la angiogénesis, tanto *in vitro* como *in vivo*, es de esperar que la liberación controlada y localizada de iones Li a partir de un vidrio bioactivo constituya una alternativa terapéutica promisoria para reparar y/o regenerar tejidos vascularizados, como por ejemplo el tejido óseo. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad proangiogénica *in vivo* de los productos iónicos de disolución liberados a partir de un vidrio bioactivo del sistema SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5 (45S5) dopado con 5% de Li_2O (45S5.5Li). Los productos de disolución fueron obtenidos por incubación de 1% de partículas de vidrio bioactivo 45S5 y 45S5.5Li (<5 µM) en medio embrionario a 37ºC durante 72 h en un agitador orbital. La concentración de iones liberados (Li, Si, P, Ca y Na) fue determinada mediante ICP-MS. La respuesta angiogénica fue evaluada usando la membrana corioalantoidea (CAM) del embrión de codorniz (*Coturnix coturnix japonica*). Los resultados evidenciaron una mayor densidad vascular (p<0.05) de la CAM a los 5 días post-estimulación con los productos iónicos de disolución del vidrio bioactivo 45S5.5Li. Además, a las 48h post-estimulación, se observó un incremento (p<0.05) en los niveles de expresión de la subunidad β_3 del marcador angiogénico integrina $\alpha_v\beta_3$ y de β-catenina analizados mediante ensayo de ELISA y western blot respectivamente. Estos resultados se atribuyen a la presencia de 0.20 mM de Li en los productos iónicos de disolución liberados a partir del vidrio 45S5.5Li. En tal sentido, los mismos podrían actuar como un agente angiogénico inorgánico alternativo a los factores de crecimiento costosos y potencialmente riesgosos.

486 (273) CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR FRENTE AL DAÑO DOBLE CADENA EN EL ADN EN CÉLULAS PLURIPOTENTES HUMANAS Y PROGENITORES NEURALES DERIVADOS DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS.

Nicolás Alexis Dimopoulos; Carolina Garcia; Guillermo Videla Richardson; Darío Fernandez Espinosa; Leonardo Romorini; Santiago Miriuka; Gustavo Sevlever; María Elida Scassa

Laboratorio de investigaciones aplicadas en neurociencias FLENI

Las células madre embrionarias (CME) deben mantener la integridad de su genoma en respuesta al daño al ADN para proteger así la vida del organismo en desarrollo. Los daños de doble cadena en el ADN (DSBs) constituyen una de las formas más deletéreas de daño celular. Fallas en la reparación de los mismos pueden conducir a inestabilidad genómica, muerte celular o cáncer. Al presente, los mecanismos involucrados en la reparación de los DSBs en CME humanas (CMEh) no se hallan del todo esclarecidos. En este trabajo caracterizamos la respuesta de CMEh, células madre pluripotentes inducidas (iPSC) y progenitores neurales (PN) derivados de CMEh a los DSBs generados por el inhibidor de la topoisomerasa I, camptotecina (CPT). Inicialmente, observamos que las CMEh y las iPSCs son hipersensibles a este genotóxico. Mediante ensayos de inmunofluorescencia y Western blot determinamos que la presencia de CPT conlleva activación de ATM (Ataxia telangiectasia mutada), fosforilación de la histona H2AX en la serina 139 y de la proteína p53 en las serinas 15 y 46. Asimismo, observamos que la hipersensibilidad al CPT se reduce notablemente al bloquear farmacológicamente la translocación de p53 a la mitocondria. Además, evaluamos el efecto de la CPT en células con mayor grado de diferenciación (PN). Estos precursores fueron derivados a partir de CMEh expuestas a un protocolo específico de diferenciación neuronal. En este caso, observamos que los PN son menos sensibles a la CPT. Esta disminución en la sensibilidad podría deberse, al menos en parte, a los cambios en la estructura del ciclo celular, a la inducción del inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas, $p21^{Waf1}$ y a la mayor expresión del factor anti-apoptótico Bcl-2 que éstos exhiben. En los 3 tipos celulares estudiados la CPT activó mecanismos apoptóticos que fueron evidenciados por pérdida de adhesión, encogimiento celular, activación de las caspasas-9 y 3, clivaje de PARP y aparición de oligonucleosomas en el citoplasma.

487 (282) EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE CICLINAS EN CÉLULAS PLURIPOTENTES HUMANAS Y EN SU PROGENIE DIFERENCIADA A LINAJE NEURAL

María Soledad Rodríguez Varela; Verónica Alejandra Furmento; Guillermo Videla Richardson; Nicolás Alexis Dimopoulos; Santiago Gabriel Miriuka; Gustavo Emilio Sevlever; María Elida Scassa; Leonardo Romorini

FLENI- Laboratorio de Biología del Desarrollo Celular

Las células madre pluripotentes humanas (CMP), embrionarias o inducidas, presentan un ciclo celular atípico donde la fase G1 se encuentra abreviada y los puntos de control ausentes. La progresión del ciclo celular de una fase a la otra está regulada por las actividades de los complejos quinasas dependientes de ciclinas (CDK/ciclinas). En células somáticas, las ciclinas exhiben una expresión periódica y altamente regulada a través del ciclo celular. Existen controversias acerca de la expresión periódica de estas proteínas en células pluripotentes. Se ha propuesto que la expresión constitutiva de ciertas ciclinas podría ser la responsable de la estructura atípica del ciclo celular que éstas exhiben. En este trabajo determinamos por citometría de flujo que las CMP presentan una población celular de fase S de 43,5±12%, mientras que su progenie diferenciada a linaje neural (Nestina+, Neurofilamento liviano+, Doblecortina+) una de 9,2±0,7% similar a la presente en fibroblastos (10%). A su vez, estudiamos los niveles de expresión de ciertas ciclinas a lo largo del ciclo en CMP y en neuroprogenitores (NP). Mediante RT-qPCR determinamos que a diferencia de células somáticas (fibroblastos) las CMP expresan altos niveles del ARNm de ciclina D2 y bajos de ciclina D1 y D3. Además, observamos que éstas exhiben altos niveles de los transcriptos de las ciclinas E1, A2 y B1. Los NP presentan un perfil de expresión similar al de las CMP de las que derivan, con excepción de los ARNm de ciclina D2 y E1 los que se encuentran significativamente reducidos. Para determinar si las ciclinas analizadas se expresan de forma periódica sincronizamos a las células en G1/S con PD0332991, inhibidor específico de CDK4/6 (30h 5µM para CMP y 24h 1µM para NP) y en G2/M con nocodazol (24h 100ng/ml para CMP y 54h 200ng/ml para NP). Análisis de RT-qPCR revelaron diferencias significativas en los niveles de expresión de los transcriptos de ciclinas sugiriendo un perfil de expresión periódico.

488 (298) GENERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CARDÍACA DE CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUCIDAS DE PACIENTES CON SÍNDROME DE QT-LARGO 2

Fernanda Cristina Paccola Mesquita[123]; Tais Hanae Kasai Brunswick[2]; Dayana Da Silva Araújo[2]; Gabriel Neiman[1]; Gustavo Monnerat Cahli[2]; Fernando E.S. Cruz[3]; Santiago Miriuka[1]; Antonio Carlos Campos De Carvalho[23]; Adriana Bastos Carvalho[2]

Fundación para la Lucha contra las enfermedades Neurologicas de la Infancia[1] Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro – RJ – Brazil[2] Instituto Nacional de Cardiologia – Rio de Janeiro – Brazil[3]

La derivación de células pluripotentes inducidas (iPSC) abre nuevas perspectivas para el Síndrome de QT-Largo (SQTL), lo que permite el estudio de la patología de la enfermedad y su respuesta específica a drogas. El objetivo de este trabajo fue generar iPSC paciente-específicos a partir de sangre periférica (SP) utilizando vectores virales y diferenciarlas a cardiomiocitos. Se aislaron células mononucleares de SP de pacientes con SQTL2 y $2x10^6$ fueron cultivadas para el enriquecimiento de eritroblastos. La coexpresión de CD36 y CD71 fue evaluada por citometría

de flujo y se realizó la transducción con virus Sendai. Colonias de iPSC fueron seleccionadas, expandidas y genotipificadas. El perfil pluripotente se evaluó mediante RT-PCR y citometría de flujo. La diferenciación cardiaca se realizó con un protocolo de inducción de 15 días. Como resultado se observó la presencia de eritroblastos con coexpresión de CD36 y CD71 (90,28 ± 3,81%; n = 6) después de 12 días de cultivo. Dos muestras fueron reprogramadas, obteniendo líneas de pacientes con SQTL2. Las colonias tenían una morfología *iPS-like* (bordes bien definidos y células redondeadas con alta relación núcleo/citoplasma) y cariotipo normal. Las iPSC expresan mRNA (OCT4, NANOG, SOX2, KLF4, DNMT3B, REX1, GDF3, TERT, Lin28 y NODAL) y proteínas relacionadas con el perfil pluripotente (OCT4, SOX2, NANOG, TRA1-60 y TRA1-81) y fueron capaces de diferenciarse a cardiomiocitos, con 72,7% de CD56 en el día 4, zonas contráctiles a partir del día 10 y con una expresión de cardio troponina T (>30%) después de 15 días de diferenciación. Actualmente nos encontramos caracterizando electrofisiológicamente el fenotipo eléctrico de los cardiomiocitos mutados, y comenzamos a realizar ensayos con tecnología CRISPR/Cas9 para corregir la mutación genética. Concluimos que una pequeña muestra de SP es suficiente para generar iPSC de pacientes con SQTL2 y diferenciarlas a cardiomiocitos.

489 (312) MODULACIÓN EJERCIDA POR HORMONAS TIROIDEAS EN UN XENOMODELO DE OSTEOSARCOMA METASTÁTICO CON COMPONENTE ESTROMAL DERIVADO DE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES

Luciana M Gutierrez[1]; María Florencia Cayrol[5]; Maríana Amorós[1]; Santiago Miriuka[2]; Gustavo Sevlever[4]; Maríana Garcia[6]; Guillermo Mazzolini[6]; Eugenie S. Kleinerman[3]; Graciela A. Cremaschi[5]; Marcela F. Bolontrade[1]
Laboratorio de Células Madre, IBYME - CONICET[1] Laboratorio de Biología del Desarrollo Celular - LIAN-CONICET - Fundación FLENI[2] M.D. Anderson Cancer Center, Division of Pediatrics and Department of Cancer Biology , Houston, TX[3] FLENI[4] BIOMED-CONICET-UCA. Lab de Neuroinmunología y Oncología Molecular[5] Lab de Terapia Génica, Universidad Austral, Pilar.[6]

El osteosarcoma (OS), tumor óseo que afecta principalmente adolescentes, permanece con un 60-70% de tasa de sobrevida de 5 años a pesar de las diversas combinaciones terapéuticas. La metástasis pulmonar es uno de los mayores determinantes de mortalidad asociada a OS. Las Células Madre Mesenquimales (MSC) componen una población heterogénea con habilidad para migrar y alojarse en tejidos en remodelación y tumores. Utilizando un xenomodelo de OS con metástasis pulmonar establecimos que MSC administradas de modo i.v. se alojan en pulmones con micrometástasis derivadas de LM7, con capacidad de incorporación hasta 20,000 veces mayor (1.15x10E5±0.07 p2/sec/cm2/sr) que la observada en ratones control, sugiriendo gran capacidad de arribo al microambiente pulmonar neoplásico metastático. El establecimiento de un tumor es un proceso complejo que involucra la interacción entre señales producidas por células tumorales y su microambiente. Esta interacción puede favorecer el crecimiento tumoral primario y la diseminación metastásica. Dentro de la compleja interacción que puede favorecer la progresión tumoral existen factores químicos definidos que modularían la progresión tumoral. Existen evidencias que sugieren efectos de las hormonas tiroideas (HTs) sobre el crecimiento tumoral y alteraciones del eje tiroideo durante el curso de enfermedades neoplásicas. En este sentido evaluamos la modulación ejercida por HTs sobre la capacidad proliferativa de células de OS. Observamos un incremento de PCNA de 8,7 veces y de Ki67 de 14,7 veces 15 hs post-estimulación con HTs (FACS). Demostramos que tanto el componente celular tumoral y el estromal en nuestro modelo expresa receptores para HTs (THRa y b). La modulación ejercida por HTs podría afectar parámetros funcionales que modulen la progresión afectando al componente estromal tumoral. Entender la progresión del OS y los mecanismos asociados a diseminación metastásica a pulmón contribuirían a la identificación de nuevos enfoques terapéuticos.

490 (461) REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA ACETILTRANSFERASA DE HISTONAS MYST4 POR LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN ESENCIALES EN CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES

María Soledad Cosentino; Claudia Solari; Ariel Waisman; Camila Vazquez Echegaray; Mara Victoria Petrone; Marcos Francia; Lino Barañao; Alejandra Guberman
IQUIBICEN

La pluripotencia y autorrenovación, propiedades fundamentales de las células madre (CM) embrionarias (CME), son mantenidas por factores de transcripción (FT) específicos, siendo los más importantes Oct4, Sox2 y Nanog. Con el objetivo de estudiar remodeladores de la cromatina relevantes en CME, analizamos estudios de ChIP a gran escala, seleccionando genes que poseen sitios de unión para dichos FT, y que por lo tanto su expresión podría estar regulada por éstos. En este trabajo estudiamos a Myst4, una acetiltransferasa de histonas que posee un elemento regulatorio altamente ocupado por los mismos. Analizamos la expresión de Myst4 por RT-qPCR, en CME murinas indiferenciadas y en distintos estadios de diferenciación. Encontramos que en los tres protocolos de diferenciación utilizados, Myst4 se reprimió notoriamente. A continuación, para estudiar la regulación en un sistema más definido, disminuimos la expresión de Oct4 y Nanog en CME mediante transfección con shRNAs específicos. La expresión de Myst4 se redujo en las condiciones en que cualquiera de los dos FT fue silenciado parcialmente. Estos resultados indican que Oct4 y/o Nanog podrían estar involucrados en la regulación transcripcional de este gen. Dado que planeamos investigar la participación de Myst4 en procesos que deben ser analizados a largo plazo, utilizamos una estrategia de shRNA inducible mediada por el vector Tet-pLKo. Obtuvimos 4 construcciones con distintas secuencias de shRNA, y sólo una de ellas produjo una alta disminución en el ARNm de Myst4 con respecto al control. Actualmente estamos generando líneas estables de CME con esta construcción y una línea control con el vector vacío. Estudiaremos el efecto del silenciamiento de Myst4 sobre el mantenimiento del estado indiferenciado y sobre la diferenciación. Consideramos que la comprensión de los mecanismos involucrados en la regulación de la estructura de la cromatina en CM pluripotentes es fundamental para su futura aplicación.

491 (475) EVALUACIÓN DEL ROL DE LA INTEGRINA ALFA 5 (α5) DURANTE LA REPROGRAMACIÓN

Gabriel Neiman[1]; Fernanda Mesquita[2]; Ximena Garate[1]; Lucia Moro[1]; Carlos Luzzani[1]; Leonardo Romorini[1]; Gustavo Sevlever[1]; Alejandra Guberman[3]; Santiago Miriuka[1]
FLENI[1] Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro – RJ – Brazil[2] Laboratorio de Regulacion Genica de Células Madre, IQUIBICEN, FCEN, UBA[3]

Las células madre pluripotentes inducidas (CMPI) se obtienen a través de la generación de células madre a partir de células somáticas adultas. Existen cuatro factores que producen células con morfología y funcionalidad similares a células madre embrionarias a partir de la activación de genes asociados a pluripotencia y a la represión de genes de la diferenciación. Existe interés creciente en estudiar el rol de la matrix extracelular (MEx) tanto en las CMPI como en su reprogramación. La MEx es una compleja red que no solo funciona como sostén de las células, sino que presenta funciones de señalización a través de receptores de membrana llamados integrinas que interaccionan principalmente con proteínas estructurales de MEx como Fibronectina (FN). Nuestro objetivo consiste en averiguar el rol de la integrina α5 en la reprogramación de fibroblastos humanos (HFF FM) y cuya interacción se da con FN. Desarrollamos una línea celular estable inducible de fibroblastos humanos HFF FM que al tratarla con doxyciclina, disminuye la expresión de α5. Por qRT-PCR, observamos una disminución de la expresión de ésta integrina en un 75%, lo que también fue verificado por citometría. Al evaluar la proliferación de los HFF FM α5, obtuvimos una disminución de ésta en un 40%. Resultados preliminares del silenciamiento de α5

mediante edición génica a través del sistema CrispR-Cas9 muestra también una disminución de la proliferación. Por citometría evaluamos la eficiencia de reprogramación en fibroblastos humanos wt y α5 a partir de la infección viral con el plásmido STEMCCA. Mantuvimos a lo largo de tres semanas la integrina α5 silenciada y evaluamos el grado de reprogramación mediante la medición de dos marcadores de pluripotencia, SSEA-4 y TRA 1-60. Obtuvimos una caída significativa en la expresión de estos marcadores. Concluimos que silenciando la integrina α5, se afecta la proliferación de los fibroblastos y por consiguiente la potencialidad de fibroblastos para ser reprogramados.

492 (550) LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN FUNDAMENTALES EN CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES MODULAN LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DEL GEN DE LA METIL-TRANSFERASA DE ARGININAS PRMT8

Camila Vázquez Echegaray[12]; Claudia Solari[12]; Soledad Cosentino[12]; María Victoria Petrone[12]; Marcos Francia[12]; Ariel Waisman[12]; Jesica Canizo[12]; Emilly Villodre[3]; Guido Lenz[3]; Santiago Miriuka[4]; Lino Barañao[12]; Alejandra Guberman[12]

IQUIBICEN[1] Dep. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires[2] Laboratório de Sinalização Celular, Dep. de Biofísica, UFRGS, Porto Alegre, Brasil[3] Laboratorio de Biología del Desarrollo Celular, FLENI[4]

Las modificaciones post-traduccionales de los residuos de histonas llevadas a cabo por remodeladores de la cromatina son parte fundamental de la regulación epigenética celular. Un tipo de modificación es la adición de grupos metilo a los residuos arginina, mediada por la familia de enzimas metiltransferasas de argininas (PRMT), cuyo principal miembro es PRMT1, fundamental en el desarrollo. Su parálogo PRMT8 se encuentra poco estudiado y se ha reportado su expresión únicamente en neuronas adultas y neurogénesis. Sin embargo, previamente encontramos que este gen se expresa en células madre pluripotentes (CMP) y que se reprime durante la diferenciación. Bajo la hipótesis que este gen podría ser regulado por los factores de transcripción (FT) fundamentales en CMP, Oct4, Sox2 y Nanog, nos propusimos estudiar su regulación. Para ello construimos un vector reportero mediante el clonado de una región del promotor de Prmt8, abarcando un sitio putativo de unión para Nanog y uno de complejos formados por FT presentes en CMP, río arriba de la secuencia codificante para la proteína luciferasa. Utilizamos el plásmido obtenido, pPrmt8-Luc, en ensayos de trans-activación en la línea celular NIH 3T3, en la cual no detectamos expresión de los factores Oct4, Sox2 y Nanog. Mediante co-transfección con distintas cantidades de vectores de expresión para dichos FT, encontramos que la actividad luciferasa fue inducida fuertemente de manera dosis-dependiente por Nanog, y en menor medida por Oct4 y Sox2. Esto indica que estos FT modulan positivamente dicha región promotora. Para profundizar este análisis estamos estudiando la regulación de este gen en su contexto endógeno, mediante RT-qPCR, tanto silenciando los mencionados FT mediante la estrategia de *short hairpin* ARN en CMP, como sobreexpresando los mismos en NIH 3T3. Esperamos que estos resultados contribuyan a la comprensión de los mecanismos moleculares relevantes para el mantenimiento de las propiedades fundamentales de CMP.

TOXICOLOGÍA 3

493 (29) ALTERACIONES REPRODUCTIVAS CAUSADAS POR EXPOSICIÓN DIARIA AL 3-METILCOLANTRENO EN LA RATA MACHO

Eric Alejandro Rhon Calderón[1]; Rocio Alejandra Galarza[12]; Alicia Graciela Faletti[12]

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos-CONICET[1] Facultad de Medicina-Universidad de Buenos Aires[2]

El 3-metilcolantreno (3MC), contaminante ambiental, es un hidrocarburo poliaromático capaz de producir respuestas tóxicas locales y sistémicas en distintos organismos. Estudios previos demostraron que el 3MC altera la función ovárica por destruir la reserva y el desarrollo folicular en roedores. El objetivo de este trabajo fue comenzar a estudiar si una exposición diaria al 3MC afecta la capacidad reproductiva en ratas machos. Para ello utilizamos ratas inmaduras expuestas diariamente a 1 mg / kg de 3MC durante 20 días. Comparado con los controles (C), la exposición al 3MC disminuyó el recuento espermático, expresado en 1x106 células/ml (3MC: 80±26; C: 185±16 $p<0.05$), aumentó el número de espermatozoides con anormalidades morfológicas, expresado en porcentaje respecto al número total de espermatozoides (3MC: 9%±1, C: 1.6%±0.4 $p<0.01$). Sin embargo, no se observaron modificaciones en el peso corporal, peso testicular o del epidídimo. Para estudiar daño genético en estos animales utilizamos dos metodologías, ensayo cometa en sangre periférica (SP), médula ósea (MO) y espermatozoides, expresado como porcentaje de ADN presente en la cola del cometa, y presencia de micronúcleos (MN) cada 1000 eritrocitos policromáticos en MO. Los animales expuestos al 3MC presentaban mayor daño al ADN en MO (6.87±0.06), SP (4.16±0.08) y en espermatozoides (16±2) respecto a los C (0.97±0.14; 0.86±0.07; 6.3±0.4; respectivamente, $p<0.01$). Respecto a los MN observamos una mayor frecuencia de los mismos en los animales expuestos al 3MC (27±7) respecto a los C (2.5±1.4, $p<0.01$). Estos resultados nos indican que una exposición diaria al 3MC, en bajas dosis, son capaces de i) alterar la capacidad reproductiva por aumentar las anormalidades morfológicas y disminuir el número de los espermatozoides totales, y de ii) aumentar el riesgo de generar procesos carcinogénicos por alterar el ADN.

494 (41) EL INSECTICIDA NEONICOTINOIDE ACETAMIPRID Y SU FORMULADO COMERCIAL ASSAIL® DIFIEREN EN SU CITOTOXICIDAD EN TROFOBLASTOS JEG-3

Diego Sebastian Gómez; Natalia Guiñazú

Facultad de Ciencias del Ambiente y la Salud - Universidad Nacional del Comahue

Los neonicotinoides (NN), son plaguicidas ampliamente utilizados a nivel regional y mundial. Los NN actúan como agonistas de los receptores nicotínicos de acetilcolina, siendo selectivos para insectos. Los efectos tóxicos sobre especies no blanco, como el hombre, se encuentran poco estudiados y no se dispone de estudios sobre mecanismos de toxicidad en el trofoblasto. El objetivo del presente trabajo fue indagar la toxicidad de NN sobre trofoblastos JEG-3, haciendo hincapié en los efectos citotóxicos y la inducción de estrés oxidativo. La línea celular JEG-3 fue expuesta a distintas concentraciones (0,1 - 100 µM) del NN acetamiprid, como principio activo (ACP) de 99,9% de pureza y en su formulación comercial Assail®, durante 1 y 24 h. Se evaluó muerte celular (vía mitocondrial) por los ensayos colorimétrico con MTT y fluorescente con rezasurina. La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) se evaluó mediante el ensayo colorimétrico de oxidación de NBT. La exposición a ACP induce pérdida de viabilidad a concentraciones de 1, 10 y 100 µM, a 1 h ($p<0,05$) y 24 h ($p<0,01$) de exposición. Mientras que Assail® disminuyó la viabilidad a todas las concentraciones ensayadas en forma dosis dependiente a 1 h ($p<0,05$) y 24 h ($p<0,05$) de exposición. Se observaron diferencias entre los resultados obtenidos por los métodos de MTT y resazurina. Se determinó que ACP no induce la producción de ROS en este modelo. Sin embargo Assail® aumentó la producción de ROS a todas las concentraciones ensayadas a 1 y 24 h de exposición ($P<0,05$). Estos hallazgos indicarían que la formulación comercial Assail® presenta mayor efecto citotóxico sobre el trofoblasto que el principio activo puro, ensayado a las mismas concentraciones. El estrés oxidativo sería uno de los mecanismos involucrados en el efecto citotóxico resultante de la exposición a Assail® en células trofoblasticas. Asimismo, indicarían la necesidad de incluir estudios de toxicidad con los formulados en los ensayos regulatorios.

495 (94) EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL TEMPRANA A UN HERBICIDA EN BASE A GLIFOSATO SOBRE EL DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMaría DE RATAS MACHO POSTPUBERALES

Melisa B. Delconte; Ayeln L. Gómez; Gabriela A. Altamirano; Enrique H. Luque; Mnica Muoz-De-Toro; Laura Kass
Instituto de Salud y Ambiente del Litoral

La exposición a glifosato durante períodos críticos del desarrollo induce efectos adversos en el sistema reproductor de ratas machos, sugiriendo su acción como perturbador endócrino (PE). Además, la glándula maMaría (GM) de ratas machos es sensible a la acción del PE, Bisfenol-A. El objetivo de este estudio es evaluar si la exposición postnatal temprana a un herbicida en base a glifosato (HBG), modifica el desarrollo mamario postpuberal. Cada 48hs, desde el día postnatal 1 (DPN1) hasta el DPN7, ratas macho de la cepa Wistar recibieron inyecciones subcutáneas de solución fisiológica (control) o una formulación comercial de 2 mg/kg/día de HBG. En DPN60, obtuvimos GMs que procesamos como *whole-mounts* (WMs) o hasta su inclusión en parafina. Evaluamos área total, crecimiento longitudinal, número de estructuras terminales y densidad maMaría. Por inmunohistoquímica, se cuantificó el índice de proliferación celular y la expresión de los receptores de estrógeno alfa (RE), progesterona (RP) y andrógenos (RA). En las WMs de animales expuestos a HBG se observó un mayor crecimiento longitudinal, un aumento en el área total y en el número de estructuras terminales que se acompañó de una menor densidad maMaría ($p<0.05$). En los cortes histológicos, se observó una disminución en el desarrollo de las estructuras lóbulo-alveolares, características de las GMs de machos en esta edad. Sin embargo, no hubo diferencias en el índice de proliferación celular. Con respecto a la expresión de los receptores de hormonas esteroideas, los animales expuestos a HBG expresaron un porcentaje mayor de células positivas para RE con respecto a los controles (19.6±7.4 vs 7.5±1.0; $p<0.05$, respectivamente), no habiendo diferencias en la expresión de RA (>70%) y siendo RP negativo para ambos grupos. En conclusión la exposición postnatal temprana a HBG modifica el desarrollo mamario y la expresión del RE en ratas macho postpuberales.

496 (187) CADMIO ALTERA EL METABOLISMO LIPÍDICO EN PULMÓN: EFECTO DE DISTINTAS FUENTES PROTEICAS

Gabriel G Boldrini; Silvina Monica Alvarez; Glenda Daniela Martin Molinero; María Gabriela Plateo Pignatari; Nidia Noemi Gómez; María Sofia Gimenez
IMIBIO-SL

Cadmio (Cd) es un metal tóxico y un importante contaminante ambiental. Se estudiaron sus efectos en el metabolismo lipídico bajo diferentes dietas. Para ello, 4 lotes de ratas Wistar, hembras fueron utilizados: 2 lotes recibieron caseína (Cas) y 2 lotes, soja (So) como fuente proteica. Dentro de cada grupo, 1 lote recibió agua potable (control-Co) y el otro, 15 ppm de Cd en el agua de bebida durante 60 días. Se determinaron los niveles de lipoperoxidación en homogenato de pulmón mediante la técnica de TBARS. Se extrajeron los lípidos del tejido y se determinó colesterol total (ColT), triglicéridos (TG) y fosfolípidos (FL). Se aisló ARN total con Trizol y se obtuvo el ADNc. Las enzimas del metabolismo lipídico, Acetil-CoA Carboxilasa (ACC), Ácido Graso Sintetasa (AGS), DiacilGlicerol O-AcilTransferasa 2 (DGAT-2), Citidilil Transferasa (CT), HidroxiMetilGlutaril CoA Reductasa (HMGCoAR) y el factor regulatorio SREBP-2 fueron determinados por PCR, usando s28 como control. TBARS mostró un aumento en el grupo So-Cd ($p<0, 01$). Los FL aumentaron ($p<0,002$) en Cas-Cd, mientras que los TG y el ColT no evidenciaron variaciones en ningún grupo. La expresión de ACC no mostró diferencias entre los diferentes grupos, mientras que AGS disminuyó con la dieta de soja respecto a la de caseína ($p<0,05$); por otro lado DGAT-2 evidenció una disminución ($p<0,01$) de su expresión en los grupos alimentados con soja respecto a los de caseína y, además, un aumento significativo ($p<0,001$) en Cas-Cd respecto a su control. Los niveles de HMGCoAR disminuyeron significativamente ($p<0,05$) en So-Cd respecto a Cas-Cd y SREBP-2 disminuyó con la dieta de soja, tanto en el control ($p<0,05$) como en el grupo con Cd ($p<0,01$). CT mostró una tendencia al aumento en los grupos intoxicados con Cd, siendo sólo significativa ($p<0,05$) en el grupo So-Cd. Esto demuestra que Cd afecta el perfil lipídico en pulmón y la expresión de las enzimas relacionadas, siendo dicho efecto modulado por la dieta.

497 (325) CAMBIOS EN LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN CÉLULAS DE LA CONJUNTIVA HUMANA EXPUESTAS A PARTÍCULAS DIESEL (DEP)

Natasha Janezic[1]; Romina M Lasagni Vitar[1]; Julia Tau[2]; Claudia G Reides[1]; Alejandro Berra[2]; Sandra M Ferreira[1]; Susana F Llesuy[1]
Cátedra de Química General e Inorgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA[1] Laboratorio de Investigaciones Oculares, Facultad de Medicina, UBA[2]

La polución ambiental es uno de los problemas que afecta a los habitantes de grande centros urbanos; una de las estructuras anatómicas vulnerable a dichos efectos son los ojos. El objetivo de este trabajo fue evaluar los cambios en los marcadores de estrés oxidativo en células de la conjuntiva humana expuestas a partículas diesel (DEP) en una concentración de 100 µg/mL. Para ello se determinaron los siguientes parámetros: especies activas del nitrógeno (EAN); actividad de superóxido dismutasa (SOD), especies activas del oxígeno(EAO) y peroxidación lipídica, a 1, 3 y 24 horas luego de la incubación con DEP. Las células expuestas a 100 µg/mL mostraron un aumento significativo de las EAN a partir de la hora, manteniéndose a las 3 y 24 horas (500% *p<0,001, 457% p<0,001* y 514% *p<0,001,* respectivamente) comparado a los valores controles. Se observó un incremento significativo en la actividad de SOD (42% *p<0,05, 74% p<0,05* y 110% *p<0,001,*respectivamente). Además, se observó un aumento significativo de EAO a la hora (91%, *p<0,01*),que luego disminuyó a las 3 y 24 horas, pero que continuó elevado con respecto al control (46%, *p<0,01* y 45%, *p<0,01,*respectivamente*).* En la peroxidación lipídica se observó un incremento a la hora con respecto al control (79% *p< 0,001*), que recupera los valores control a las 3 horas. A partir de estos resultados se sugiere que en las células de conjuntiva humana existe un aumento temprano en la producción de especies activas del oxígeno y del nitrógeno y en la peroxidación lipídica como consecuencia de la exposición a DEP. Por otro lado, se observa un incremento simultáneo de la actividad de SOD, indicando que hay una respuesta adaptativa temprana por parte de la célula para contrarrestar el aumento del entorno oxidativo. Estos hallazgos indicarían que el estrés oxidativo podría ser uno de los posibles mecanismos tempranos de daño de las células de la conjuntiva humana cuando son expuestas a las partículas diesel.

498 (473) OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GLIFOSATO Y AMPA EN AGUAS DE CONSUMO HUMANO

Juan M Ostera; Julián G Bonetto; Valentina Olmos; Edda Villaamil Lepori
Fac. de Farmacia y Bioquímica

El glifosato (GLI) es un herbicida no selectivo utilizado para eliminar malezas en cultivos transgénicos. La biodegradación del GLI ocurre principalmente por microorganismos, siendo el ácido aminometilfosfónico (AMPA) uno de los productos de degradación. Se ha detectado la presencia del GLI y AMPA en cuerpos de agua cercanos a zonas de cultivo intensivo de transgénicos, y en fuentes de agua potable siendo esta situación relevante para las poblaciones humanas. El objetivo del trabajo fue optimizar un método por HPLC con detección fluorométrica, para cuantificar GLI y AMPA en agua. Se usaron aguas enriquecidas con GLI y AMPA en concentraciones entre 0,5 y 10 µg/L. Las determinaciones se hicieron por cuadruplicado. Para mejorar la detección de GLI y AMPA se realizó derivatización precolumna con 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC). Se ajustaron la concentración de FMOC, el tiempo y la temperatura de derivatización, que finalmente se establecieron en: FMOC 230 mg/L en acetonitrilo (ACN), durante 3 horas a temperatura ambiente. La derivatización se finalizó con el agregado de ácido fosfórico 2% v/v, y el exceso de derivatizante se extrajo con acetato de etilo. Se utilizó un UPLC Acquity (Waters) provisto de una bomba binaria, un inyector automático y

un detector FLR. La columna usada fue una Acquity UPLC BEH SHIELD RP18 (1,7 µm) 2,1 x 50 mm. La fase móvil utilizada fue buffer KH_2PO_4 0,5 M pH 5,5: ACN (76:24) con gradiente de flujo. El volumen de inyección fue de 10 µL y la detección fue con λ_{ex}=315 nm y λ_{em}=365 nm. En estas condiciones el tiempo de retención de GLI fue de 1,33 min y el de AMPA fue de 3,86 min. Los límites de detección y cuantificación fueron de 0,2 µg/L y 0,5 µg/L para GLI y de 1,1 µg/L y 2,2 µg/L para AMPA, respectivamente. Se comprobó la linealidad hasta 10 µg/L (Ro= 0,9989, P<0,0001). El método, así optimizado, resultó adecuado para el monitoreo de la presencia de GLI en recursos hídricos. Estudio financiado con fondos del proyecto PID 0032/2011.

499 (486) PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS MODULAN LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES MUSCARÍNICOS EN LA PLACENTA Y EN EL TROFOBLASTO

María Sol Colobig[1];Berta Emma Vera[2]; Natalia Guiñazú[1]
Facultad de Ciencias de Salud y Ambiente, Universidad Nacional del Comahue[1] Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional del Comahue[2]

Se conoce que la placenta humana contiene todos componentes del sistema colinérgico, incluidos los receptores muscarínicos (mAChR) M1, M2, M3, M4. Considerando que mujeres embarazadas residentes rurales del Alto Valle se encuentran expuestas ambientalmente a plaguicidas organofosforados (OP) y que en modelos murinos se demostró alteraciones en esos receptores debido a OP, se analizó la expresión de mAChR en placentas de mujeres expuestas y en un modelo de exposición in vitro de trofoblastos JEG-3.

Estudio poblacional: Se estudiaron 8 placentas sin historia de exposición a OP (control), y 28 placentas de residentes rurales, colectadas en período de aplicación (PP) (n=13), y en período de receso (PR) (n=15). *Estudios in vitro*: Se cultivaron trofoblastos JEG-3 en presencia de los OP: clorpirifos (CP) y metilazinfos (MA), utilizando diferentes concentraciones (entre 0,01-100 µM), por un tiempo de 4 y 8 hs. Las células control fueron tratadas con DMSO. Mediante RT-PCR se estudió la expresión del transcripto para M1, M2, M3 y M4 y del control interno ciclofilina.

No se observaron cambios en la expresión de M1, M2 y M3 en el estudio poblacional entre los grupos estudiados. El receptor M4 se encontró expresado en muestras rurales de PP, mientras que no se observó expresión en grupos control y PR. El estudio *in vitro*, demostró que CP induce la expresión de M1 en todas las concentraciones a 4 hs de incubación (p <0,05). No se observaron cambios significativos en la expresión de M2, M3 y M4. Cuando las células se incubaron con MA no hubo cambios significativos

El sistema colinérgico, mediante la expresión de sus receptores, puede regular el flujo sanguíneo, el transporte de aminoácidos y la liberación de hormonas placentarias y de ácidos grasos. Se demostró que la exposición ambiental humana a plaguicidas induce la expresión de M4 en la placenta, por lo que estas funciones podrían estar alteradas. Asimismo, este efecto dependería del OP al que se encuentre expuesta la población

500 (517) ESTUDIO DE LOS MECANISMOS PRESORES DEL TOXICO AMBIENTAL HEXACLOROBENCENO

María Del Rocío Castilla Lozano[1]; Agustn Asuaje[2]; Stephanie Riviere[1]; Pedro Martin[2]; Gabriel Cao[1]; Giselle Romero Caimi[2]; Diana Kleiman De Pisarev[3]; Veronica Milesi[2]; Laura Alvarez[2]
ININCA[1] IIFP[2] UBA- Facultad de Medicina[3]

El hexaclorobenceno (HCB) es un pesticida organoclorado bioacumulable. En animales de experimentación induce efectos neurotóxicos, y disfunción inmunológica y endócrina. Hemos demostrado que el HCB altera la homeostasis de las hormonas tiroideas (HT) séricas y tisulares, y la actividad de las deiodinasas II (DII) A su vez, la triiodotironina (T_3) regula la expresión del receptor de estrógeno alfa (REα). Tanto las (HT) como los REα tienen efectos en la hemodinámica cardiovascular, y regulan la presión arterial (PA). Por ello investigamos en un modelo experimental murino el efecto del HCB sobre la función vascular. Se trataron diariamente, ratas Wistar hembras con HCB (5 y 500 mg/kg de p.c.), durante 45 días. Se analizaron: PA y niveles de T_3 y T_4 séricos; en aorta: ancho de la pared; niveles proteicos de REα ,PCNA y de la MAPK ERK (Western Blot), niveles de RNAm de D II (RT-PCR), y contractilidad arterial, por medición de tensión isométrica en anillos de aorta estimulados con noradrenalina (NA). *Resultados:* El HCB (5 mg/Kg) no cambió la PA, y presentó mayor sensibilidad a NA (EC50 14,5±3,2 nM vs 24,7±4,1 nM, p<0,001) y menor respuesta contráctil máxima (RCM) (337,5±28.9 vs 683,8±37,4 mgF/mgP, p<0,05). El RNAm de la DII y del REα disminuyeron significativamente (30% y 18%, respectivamente). Con HCB (500 mg/Kg) aumentó un 25% la PA (149 vs 128 mmHg), y la sensibilidad a NA (EC50 8,7±1,1 vs 24,7±4,1 nM, p<0,001) y disminuyó la RCM (481,8±38,2 vs 683,8±37,4 mgF/mgP en control p<0,05). Los niveles de RNAm de DII y REα disminuyeron significativamente (33 y 38%) así como los de los de PCNA y MAPK ERK (24% ($p \leq 0,05$) y 25%($p \leq 0,05$)), respectivamente. Conclusión: La administración de HCB genera hipertensión y sensibiliza la aorta a estímulos del SN. La DII así como los REα podrían, en parte, estar involucrados en su mecanismo de acción. Estos hallazgos permitirían evidenciar moléculas claves que podrían anteceder en el tiempo al desarrollo de la patología hipertensiva.

501 (534) LA INTOXICACIÓN CON CADMIO INDUCE CAMBIOS EN EL METABOLISMO LIPÍDICO EN CEREBRO DE RATA CON 20 DÍAS DE GESTACIÓN

Veronica Biaggio[1]; Karina Altamirano[1]; Silvana Piguillem[2]; María Verónica Pérez Chaca[2]; Nidia Gómez[1]; María Sofia Gimenez[1]
IMIBIO-SL[1] Laboratorio de Morfoloía-Universidad Nacional de San Luis[2]

La exposición a metales tóxicos durante la gestación es uno de los factores que altera el ambiente fetal y en consecuencia aumenta el riesgo de trastornos metabólicos en la edad adulta. El cadmio (Cd), se acumula en la placenta induciendo bajo peso al nacer y alterando el metabolismo lipídico. Nuestro objetivo fue evaluar el posible rol protectivo del consumo de proteína de soja frente a los mecanismos mediante los cuales Cd ejerce su toxicidad. Se trabajó con 4 lotes de ratas Wistar hembras; 2 lotes recibieron caseína y los otros dos lotessoja, como fuente proteica. En cada grupo 1 lote recibió agua corriente y el otro 15ppm de Cd en agua de bebida durante la preñez (20 días de gestación).Se determinó la concentración de Cd en el tejido fetal y la concentración sérica de TG y CL en la madre. Se analizó FL y CL en tejido fetal y se determinó la expresión por RT-PCR de enzimas involucradas en el metabolismo lipídico; ACC, FAS y CT y los factores SREBP 1c y SREBP-2. Se realizó histología del tejido fetal.Los TG séricos disminuyeron (p<0.001), comparado con el grupo control. En tejido fetal la concentración de FL totales disminuyó en ambos grupos intoxicados (p<0.01). La expresión de ACC aumentó en el grupo Cas-Cd (p<0.01); mientras que en el grupo Soja-Cd disminuyó (p<0.05). FAS no modificó su expresión y CTincrementó en el grupo Soja-Cd (p<0.05).La expresión de SREBP-1c aumentó en el grupo Cas-Cd (p<0.001), mientras que SREBP-2 disminuyó en ambos grupos intoxicados (p<0.001), con respecto al grupo control.El análisis morfológico demostró menor desarrollo y diferenciación en las capas más externas de la corteza. Conclusión: Los resultados obtenidos demuestran un aumento en la síntesis de AG, posiblemente con el fin de favorecer el crecimiento. La expresión de las enzimas ACC y CT y el factor SREBP-1c reflejarían esta situación. Sin embargo, la morfología revela poca diferenciación celular entre las capas que conforman la región más externa de la corteza cerebral.

502 (607) EXPOSICIÓN AL PLAGUICIDA ORGANOFOSFORADO CLORPIRIFOS AFECTA EL EJE HIPÓFISO-GONADAL Y MODULA LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES HORMONALES EN EL ÚTERO DE RATAS

María Rosa Ramos Nieto[1]; Clara Ventura[1]; Nadia Bourguignon[2]; Victoria Lux-Lantos[2]; Clarisa Santamarina[3]; Horacio Rodríguez[3]; Andrea Randi[4]; Claudia Cocca[1]; Mariel Nuñez[1]
Laboratorio de Radioisótopos-Facultad de Farmacia y Bio-

química[1] IBYME[2] ISAL[3] Laboratorio de efectos biológicos de contaminantes ambientales- F. Medicina. UBA[4]

Previamente mostramos que el plaguicida clorpirifos (CPF) actúa como disruptor endócrino (DE) en glándula maMaría de rata. Objetivo: estudiar los efectos del CPF sobre el eje hipófisis-ovario y sus acciones sobre el útero, principal órgano blanco de este eje. Métodos: Ratas Sprague-Dawley hembras de 40 días de vida fueron expuestas a CPF 0,01 (CPF 0,01) y 1 mg/Kg/día (CPF 1) o vehículo (C) durante 100 días por vía oral. Determinamos: niveles de estradiol (E2), progesterona (Pg) y testosterona (T) en suero y ovario, y niveles séricos de gonadotrofinas (LH y FSH) por radioinmunoensayo; expresión de las enzimas esteroidogénicas CYP11 y CYP19 por PCR en tiempo real; expresión del receptor de estrógeno alfa (REα), del receptor de progesterona (RPg) y del marcador de proliferación PCNA por inmunohistoquímica en los úteros. Resultados: CPF 1 reduce el E2 (11,7 ± 3,0 vs. 22,3 ± 6,3 pg/ml del C, p<0,05) y la Pg séricos (2,1 ± 0,7 vs. 4,0 ± 0,8 ng/ml del C, p<0,05), sin alterar la concentración de T. El contenido ovárico de E2 fue reducido por CPF 1 (363,3 ± 224,4 vs. 1385,4 ± 507,3 ng del C, p<0,05) junto con una menor expresión de CYP 11 (41%, p<0,001), sin cambios en CYP19. Por otra parte, el CPF 0,01 y 1 redujeron los niveles de LH (1,4 ± 0,1 y 1,9 ± 0,3 respectivamente, vs. 2,8 ± 0,2 ng/ml del C, p<0,01), sin alterar la concentración de FSH. A su vez, CPF 1 disminuyó la liberación de LH (6,1 ± 1,7 vs. 15,8 ± 2,7 ng/ml del C, p<0,05) en ratas ovariectomizadas. En útero, CPF 1 incrementó la expresión del RPg en las glándulas endometriales (81%, p<0,05), mientras que CPF 0,01 aumentó la expresión del RPg (85,7%, p<0,05) y del REα (62,2%, p<0,05) en endometrio. La expresión de PCNA y el peso del útero no fueron alterados por CPF. Conclusión: estos resultados demuestran que el CPF actúa como un DE, afectando la síntesis de hormonas esteroideas, su regulación hipofisaria y la expresión de sus receptores en útero, alertando sobre sus efectos en la salud reproductiva.

503 (627) ALTERACIONES EN PARÁMETROS ENDÓCRINOS E INFLAMATORIOS INDUCIDOS POR HEXACLOROBENCENO EN UN MODELO DE ENDOMETRIOSIS EN RATA

Marcela Susana Sanchez[1]; Florencia Chiappini[1]; Mariela Bilotas[2]; Noelia Victoria Miret[1]; Elsa Zotta[3]; Claudia Cocca[4]; Andrea Silvana Randi[1]
Laboratorio de Efectos Biológicos de Contaminantes Ambientales, Fac. Medicina, UBA[1] Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)[2] Laboratorio de Fisiopatogenia, Sección Patología, Depto de Ciencias Fisiológicas, Fac Medicina. UBA[3] Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y BioQuímica, UBA[4]

El Hexaclorobenceno (HCB) es un pesticida de alta persistencia ambiental y bioacumulación. Las fuentes de exposición son alimento, inhalación de aire y a través del útero. Compuestos organoclorados interfieren con la homeostasis endocrina y afectan la salud reproductiva. La endometriosis es un desorden ginecológico, dependiente de estrógenos, por presencia de tejido endometrial fuera del útero. La Ciclooxigenasa-2 (COX-2) y las metaloproteasas 2 (MMP-2) y 9 (MMP-9), están involucradas en proliferación, migración, invasión y angiogénesis asociadas a endometriosis. Previamente observamos que la exposición de ratas al HCB aumenta el volumen de lesiones y el área vascularizada, tanto en lesiones como en endometrio eutópico. Objetivo: estudiar si el HCB (0, 1, 10 y 100 mg/kg p.c.) altera parámetros endocrinos e inflamatorios en un modelo de endometriosis en ratas expuestas durante 30 días. Analizamos lesiones endometriósicas (L) y endometrio eutópico (EU), evaluando: a) cambios histológicos, b) expresión de MMP2, MMP9 y de COX-2 (inmunoblot), c) niveles de receptor de estrógenos α (REα) (inmunohistoquímica), d) expresión de VEGF (inmunoblot), y e) contenido de TNFα en líquido peritoneal (ELISA). Nuestros resultados mostraron el incremento en: el área de glándulas en EU (HCB1 57% y HCB100 52%,p<0.05); la expresión de MMP2 en L (HCB10 25% y HCB100 43%, p<0.05) y en EU (HCB100 47%,p<0.05); la expresión de MMP9 en L (HCB10 27%, HCB100 40%, p< 0.05) y en EU (HCB10 48% y HCB100 50%, p<0.01); los niveles de COX-2 en EU (HCB1 20%, p<0.05; HCB10 52%, HCB100 55%, p<0.01). Asimismo observamos elevado el contenido de TNFα en líquido peritoneal en HCB1 30%, p<0.05 y HCB10 55%, p<0.001; así como la expresión de VEGF en L (HCB1, HCB10 y HCB100 90%,p<0.05) y en EU (HCB1 y HCB10, 45%,p<0.05). Los niveles de REα aumentaron en HCB1 110%, p<0.05. La exposición de ratas al HCB incrementa parámetros endocrinos e inflamatorios, contribuyendo en el desarrollo y severidad de la endometriosis.

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES 3

504 (275) PARTICIPACIÓN DE AKAP350 EN LA FORMACIÓN DE ESTRUCTURAS EPITELIALES ORGANOTÍPICAS

Evangelina Almada[1]; Facundo M. Tonucci[1]; Anabella Ferretti[1]; Florencia Hidalgo[1]; Cristian Favre[1]; Rodrigo Vena[3]; Arlinet Kierbel[2]; M. Cecilia Larocca[1]
IFISE[1] IIB-INTECH[2] IBR[3]

La adquisición y el mantenimiento de la polaridad epitelial son centrales en procesos de relevancia fisiológica y patológica. Las etapas tempranas en la polarización epitelial dependen de las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular (MEC). Las integrinas son proteínas que median la interacción con la MEC, con un rol central en el establecimiento de la polaridad epitelial. AKAP350 es una proteína asociada a la organización de los microtúbulos que interviene en la generación del polo apical en células hepáticas, y del polo anterior en células migratorias. Nuestro objetivo fue evaluar la participación de AKAP350 en el establecimiento de la polaridad epitelial simple. Las células MDCK crecidas en filtros desarrollan polaridad epitelial 2D, mientras que en presencia de MEC generan estructuras tipo quistes. Analizamos el desarrollo de la polaridad epitelial en células MDCK controles o con expresión disminuida de AKAP350 (KD), detectando la localización del centrosoma, la actina y las uniones estrechas. Las células AKAP350KD crecidas en filtros mostraron patrones normales de polaridad, mientras que, en presencia de MEC, formaron quistes anómalos: con polaridad invertida, sin polaridad, y complejos. El análisis de las fases tempranas en la formación de los quistes mostró que en las células AKAP350KD la división se da en una orientación perpendicular a la normal. Los quistes invertidos se asocian a una alteración temprana en el eje de polaridad, mientras que los quistes complejos provienen de células con alteración en la ubicación del huso mitótico, estando ambos fenotipos asociados a la deficiencia en las vías dependientes de integrinas. Conclusión: AKAP350 participa en el establecimiento del eje de polaridad epitelial columnar y en el mantenimiento de la misma, mediante eventos que dependen de la interacción de la célula-MEC. Nuestros próximos estudios se focalizarán en la relación de AKAP350 con las vías de señalización activadas por integrinas.

505 (280) AQP2 MODULA LA ENTRADA CAPACITATIVA DE CALCIO FACILITANDO EL ACOPLAMIENTO TRPV4-SK3

Alejandro Pizzoni; Juana Rajoy; Gisela Di Giusto; Valeria Rivarola; Claudia Capurro; Paula Ford
Lab de Biomembranas, IFIBIO Houssay

En distintos sistemas se ha descripto que la entrada de Ca^{2+} a través de canales TRPV4 conduciría a la activación local de canales de K^+ activados por calcio (K_{Ca}) produciendo una hiperpolarización. Previamente describimos en células renales que el canal de agua Acuaporina2 (AQP2) y el canal de calcio (TRPV4) actuarían en forma conjunta para sensar cambios de osmolaridad y activar mecanismos de regulación del volumen vinculados a la salida de K^+. El objetivo de nuestro actual trabajo fue estudiar los cambios de potencial de membrana que se producen en las células renales al activar el TRPV4 en función de la presencia de AQP2 y su influencia en la entrada capacitativa de Ca^{2+}. Utilizando distintos fluoróforos estudiamos los cambios en el potencial de membrana ($Dibac_4(3)$) y en la entrada de calcio (Fura2-AM) que ocurren al activar el TRPV4. Realizamos experimentos en dos líneas celulares

renales; una que no expresa AQP2 (WT-RCCD$_1$) y otra transfectada con AQP2 (AQP2-RCCD$_1$). Encontramos que, utilizando un activador específico del TRPV4 (4-α-PDD, 10 μM), las células WT se despolarizan y las AQP2 se hiperpolarizan. Esta hiperpolarización no ocurre en presencia de apamina (300 nM) lo que indicaría que en las células AQP2 la activación de TRPV4 lleva a su vez a la activación un K_{Ca}, el SK3. Por otra parte, utilizamos un protocolo clásico para el estudio de la entrada capacitativa de calcio que se produce al vaciar los depósitos por incubación con tapsigargina (1 μM). Encontramos que al activar el TRPV4 con 4-α-PDD, la entrada capacitativa fue mayor en las células que expresan AQP2 respecto de las WT (Área bajo la curva AQP2: 2491 ± 149, WT: 1298 ± 95 p<0.001, máximo AQP2: 6.9 ± 0.3, WT: 4.3 ± 0.27 p<0.001, n_{AQP2} = 194 células, n_{WT}= 155 células de 5 experimentos independientes). Estos resultados indicarían una influencia de la interacción AQP2-TRPV4 en la activación del canal SK3 potenciando la entrada capacitativa de Ca^{2+} al modificar la fuerza impulsora.

506 (286) EFECTOS DE LA FOSFORILACIÓN POR PKA DEL RESIDUO S173 DE AMPKα1 EN LA SUPERVIVENCIA DURANTE LA FALTA DE GLUCOSA EN CÉLULAS DERIVADAS DEHEPATOCARCINOMA

Anabela C Ferretti; Facundo Tonucci; Florencia Hidalgo; Evangelina Almada; Mara Ojeda; María C Larocca; Cristian Favre
IFISE

Las quinasas AMPK y PKA intervienen en la regulación de la proliferación y la muerte celular en respuesta a señales metabólicas y de crecimiento. Demostramos que la ausencia de glucosa produce disminución de la viabilidad en células C3A, asociada a la inducción de apoptosis y al arresto del ciclo celular. Por otro lado, esta condición nutricional induce la activación temprana de PKA y AMPK. Detectamos que PKA fosforila y regula negativamente la activación de AMPK. Existen tres residuos de AMPK fosforilables por PKA: S485, S497 y S173, la fosforilación del último inhibe alostéricamente la activación de AMPK. En este estudio evaluamos la contribución específica de AMPK en la muerte celular producida por falta de glucosa y analizamos el impacto regulatorio del residuo S173 en la supervivencia en esta condición nutricional. Se incubaron células C3A con un siRNA para AMPKα1 (O1) o con un siRNA control (SC) en presencia (C) o ausencia de glucosa (Glc0) por 24h seguido de tinción con Anexina V/IP. El silenciamiento de AMPK previno la inducción de apoptosis en ausencia de glucosa (Glc0 O1:1,5±0,1* vs Glc0 SC:2,8±0,2; C SC:1). Construimos C3A estables expresando mutaciones de AMPKα1: S173C y S173D y expresando la forma salvaje de AMPKα1 (WT). Mediante el ensayo de MTT a distintos tiempos observamos que el aumento de células viables fue considerablemente menor en el clon S173C, tanto en presencia como en ausencia de glucosa (S173C:200,4±25,3%* vs WT:264,8±31,0%; S173C Glc0:145,0±17,5%* vs WT Glc0:179,6±27,1%, 48h). El clon S173D no mostró cambios significativos en el% de células apoptóticas al quitar glucosa del medio (36h), mientras que en el clon S173C este% se duplicó respecto al WT (S173C Glc0:3,1±0,3* vs WT Glc0:1,6±0,1; WT:1). Concluimos que AMPK controla fuertemente la supervivencia de las células C3A sujetas a falta de glucosa, y la anulación de la función del residuo S173 de AMPKα1 produce un importante aumento de la sensibilidad a esta condición. *p<0,05.

507 (342) METFORMINA REGULA LA FOSFORILACIÓN DE ß-CATENINA Y LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES INTESTINALES

Gastón Federico Amable[1]; Laura Inés Anaya[2]; Gustavo Daniel Frechtel[1]; Francisca Rojas[2]; Silvia Del Valle[2]; Mabel Lardo[3]; Susana Truyen[3]; Osvaldo Rey[1]
INIGEM[1] División de Hematología, Hospital de Clínicas "José de San Martín", UBA[2] INFIBIO, Departamento de Bioquímica Clínica, Sección Hematología, Facultad de Farmacia y Bioquímica[3]

El cáncer colorrectal (CCR) es la tercer causa de muerte por cáncer en la Argentina con 11.000 nuevos diagnósticos por año. El CCR se desarrolla como resultado de la desregulación de distintas vías de señalización incluyendo Wnt/ß-catenina, una vía defectuosa en hasta 90% de los casos de CCR. El elemento principal en esta vía es β-catenina, una proteína regulada por múltiples fosforilaciones. Numerosos estudios también muestran que la obesidad y diabetes mellitus tipo 2 (DM2), desórdenes metabólicos caracterizados por resistencia a insulina y por cambios en la producción de insulina e IGF1, están asociadas a un significativo incremento en el riesgo de desarrollar CCR. A pesar de la importancia de estas observaciones, aún no se sabe si existe una relación específica entre estos factores y los mecanismos que regulan la proliferación y diferenciación de los colonocitos. Recientes datos indican que metformina, el fármaco mundialmente más empleado en el tratamiento de la DM2, muestra actividades asociadas a la prevención y tratamiento de distintas patologías incluyendo el CCR. Al respecto, un reciente meta-análisis de 2.461 pacientes diabéticos con CCR mostró que el riesgo de muerte por CCR se redujo en un 34% en pacientes tratados con metformina comparado con aquellos que no la recibían. Lamentablemente no existe información acerca de como metformina podría mediar este efecto terapéutico. Dentro de este contexto, nuestros resultados muestran que en colonocitos derivados de tejido tumoral humano, insulina e IGF1 promueven la fosforilación de Ser552 en ß-catenina a través de Akt y que tanto Akt como la fosforilación de Ser552 son inhibidas por metformina. Más aún, metformina inhibe la activación de ERK y la proliferación celular. En conclusión, estos estudios indican que metformina interfiere con la actividad de vías de señalización intimamente asociadas al desarrollo del CCR y sugieren que este fármaco ofrece un nuevo método terapeútico para el tratamiento del CCR.

508 (412) EFECTO DE FKBPS SOBRE EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN E2F Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Sonia Alejandra De Leo[12]; M. Fernanda Camisay[12]; Martín Monte[12]; Mario D. Galigniana[23]; Alejandra G. Erlejman[12]
IQUIBICEN[1] Dpto. Química Biológica - Fac. de Cs. Exactas - Univ.de Buenos Aires[2] IBYME[3]

Las proteínas FKBP (*FK506-binding protein*) de 51 y 52-kDa (FKBP51 y FKBP52) modulan la actividad transcripcional de receptores de esteroides, y de otros factores de transcripción como NF-κB y p53, los cuales participan en la regulación de la proliferación celular. La expresión de FKBP51 se ha encontrado alterada en diversos tipos de tumores. Los factores de transcripción de la familia E2F son reguladores del ciclo celular, entre ellos hay tanto activadores (E2F1, E2F2) como represores (E2F4). Frente a estos antecedentes, nuestro objetivo fue evaluar el efecto de FKBP51 y de su competidor natural FKBP52 en la proliferación celular, así como la posible modulación de E2F por FKBPs. Se generaron células HEK293 que sobreexpresan establemente FKBP51 (HEK51$^+$). Se evaluó la viabilidad celular por recuento de células viables con Azul de Tripán, por ensayo de MTT y por CSFE. Luego de 96 h de cultivo, las células HEK 51$^+$ incrementaron 51,8% su número respecto a la línea parenteral HEK WT y el silenciamiento de FKBP51 en células HEK51$^+$ disminuyó 44±5% el número de células (*p=0,003*). La sobreexpresión transitoria de FKBP51 en HEK WT aumentó 894±36% su viabilidad celular, mientras que la sobreexpresión transitoria de FKBP52 sólo produjo un incremento del 24±7%. Por medio de ensayos de gen reportero en HEK293 se evaluó la actividad transcripcional para E2F. FKBP52 generó un incremento significativo de la actividad transcripcional de E2F2 (519±65%) y de E2F4 (553±39%) respecto al control. Asimismo, FKBP51 aumentó la actividad transcripcional de E2F2 (197±69%) y de E2F4 (232±49%). Ninguna de estas FKBPs tuvo efecto sobre E2F1. Concluimos que FKBP51 estimula la proliferación celular. Proponemos que tanto FKBP51 como FKBP52 regulan la actividad transcripcional de los factores E2F, y que el efecto de FKBP51 y de FKBP52 sobre la proliferación celular sería dependiente de la contribución de los diferentes E2F, tanto activadores como represores.

509 (413) MICROTÚBULOS Y AKAP350: REGULADORES CLAVE EN LA FORMACIÓN DE ``BRUSH BORDER`` INDUCIDA POR LKB1

Facundo Tonucci[1]; Evangelina Almada[1]; Anabela Ferreti[1]; Florencia Hidalgo[1]; Cristian Favre[1]; Cecilia Larocca[1]; Irina Kaverina[2]
IFISE[1] Dep. of Cell and Developmental Biology, Vanderbilt University, Nashville TN[2]

La estructura apical de *brush border* (BB) en los enterocitos es esencial en el transporte intestinal de nutrientes. AKAP350 es una proteína de andamiaje que participa en la nucleación de microtúbulos en el aparato de Golgi (AG) y en el centrosoma. Previamente demostramos que AKAP350 participa en procesos de adquisición de polaridad tales como el desarrollo de estructuras apicales en células hepáticas y el ubicación del centrosoma en células migratorias. Nuestro objetivo fue evaluar la participación de los microtubulos derivados del AG y/o del centrosoma en la formación del BB. Utilizamos células W4 con expresión de LKB1 y STRAD inducible por doxiciclina. La inducción de STRAD estabiliza a LKB1 promoviendo su activación y el subsecuente desarrollo de un programa de polaridad epitelial que culmina con la formación de un BB rico en actina. Luego de la activación con doxiciclina, despolimerizamos los microtúbulos con nocodazol. En estas condiciones, las células no fueron capaces de formar BB. Para analizar la dinámica de ese proceso, transfectamos las células con el marcador de "plus-ends" EB3-Cherry y obtuvimos imágenes de las células vivas durante la activación con doxiciclina. Observamos que, previo al enriquecimiento de actina en el BB, los microtúbulos crecieron hacia ese polo. Con el fin de diferenciar la participación de los microtúbulos derivados del AG y del centrosoma, expresamos AKAP350CTD o AKAP350NTD, que deslocalizan AKAP350 del centrosoma y del AG, respectivamente. Asimismo, tratamos células con Brefeldina A para desorganizar el AG. En cada caso, cuantificamos la fracción de células con BB por microscopía confocal. Se observó reducción en la formación del BB en las células AKAP350CTD (-30%, p<0,05), sin evidenciarse diferencias en las células AKAP350NTD o tratadas con Brefeldina A. Nuestros resultados indican la relevancia de los microtúbulos en la formación del BB y la participación especifica de AKAP350 centrosomal en este proceso.

510 (443) EFECTOS ANTIPROLIFERATIVOS DEL BORTEZOMIB EN CÉLULAS ENDOTELIALES TRANSFORMADAS POR EL RECEPTOR VIRAL GPCR ASOCIADO AL SARCOMA DE KAPOSI: PAPEL DE LA FOSFATASA MKP-3 Y P-ERK

Alejandra Suares[1];Mercedes Mori Sequeiros[2]; Cristina Paz[2]; Verónica González Pardo[1]
INBIOSUR, CONICET-UNS[1] INBIOMED, Facultad de Medicina, UBA[2]

La expresión y activación del receptor acoplado a proteína G del Herpes virus asociado al sarcoma de Kaposi (vGPCR) promueven la activación de la vía NFkB, clave para la transformación tumoral de las células endoteliales y desarrollo de la enfermedad. Previamente demostramos que Bortezomib (Btz) disminuye la actividad nuclear de NFkB e induce apoptosis en células endoteliales que expresan el vGPCR (células vGPCR). Más aún, Btz aumenta la expresión de la proteína proapoptótica Bim e induce el clivaje de caspasa-3. Aquí investigamos el efecto de Btz sobre la proliferación de las células vGPCR y su correspondiente mecanismo. Demostramos que Btz (0,25-1nM) disminuye el número de células, siendo efectivas las dosis 0,5 nM (54,2 ± 18%) y 1 nM (17,1 ± 5,6%) vs. el control (100 ± 23,2%) e induce cambios en su morfología. MKP-3 es una MAPK fosfatasas que desfosforila a P-ERK1/2 y que también es capaz de desfosforilar al factor de transcripción FOXO1, promoviendo su localización nuclear y activación. Aquí demostramos que Btz induce los niveles de MKP-3, efecto seguido de una disminución en los niveles de P-ERK1/2 y P-FOXO1 en forma dependiente del tiempo (1,5-32 h) y la concentración (0,25-1 nM). Btz (0,5nM) promovió la disminución de P-ERK1/2 en el núcleo y la reorganización del citoesqueleto de actina. FOXO1 es necesario para la transcripción del inhibidor del ciclo celular p21. En línea con la desfosforilación y consecuente activación de FOXO1, se demostró que Btz (0,5nM, 24h) aumenta los niveles del ARNm de p21 al mismo tiempo que disminuye la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). En conjunto, estos resultados sugieren que Btz inhibe la proliferación de las células vGPCR a través de un mecanismo que incluye la inducción de MKP-3, cuya actividad conduce a la desfosforilación de P-ERK y P-FOXO1. La expresión de p21 como consecuencia de la activación de FOXO1 junto con la menor expresión de VEGF contribuiría a una menor proliferación celular

511 (476) ESTUDIO FUNCIONAL DE LA MODULACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN AP-1 POR PROTEÍNAS FKBPS

María Fernanda Camisay[23]; Sonia A. De Leo[23]; Vanina Fontana[24]; Gisela I. Mazaira[23]; Mario D. Galigniana[24]; Alejandra G. Erlejman[23]
Depto. Quim. Biológica, Fac. Cs. Exactas y Naturales, Univ. de Buenos Aires[2] IQUIBICEN[3] IBYME[4]

La proteína activadora 1 (AP-1) es un factor de transcripción que participa en procesos celulares como la proliferación y la respuesta al estrés. AP-1 activa a genes que contienen elementos de respuesta a ésteres de forbol. Recientemente, demostramos que las inmunofilinas de la subfamilia FKBP (FK506-binding proteins), FKBP51 y FKBP52 regulan la localización subcelular y la actividad transcripcional de receptores esteroidales y NF-kB. Dado que AP-1 y NF-kB intervienen en vías de señalización similares, hipotetizamos que las FKBPs podrían regular a AP-1. En estudios de gen reportero la activación de AP-1 en respuesta a PMA - éster de forbol – fue considerada como un 100% de activación. FKBP52 incrementó esta activación desde 350±35.5% a 6972±569% (p<0,001) en células HEK293T transfectadas con un plásmido de expresión para FKBP52 (0,5-1,5ug). Por el contrario, FKBP51 inhibió la actividad transcripcional de AP-1 en forma concentración dependiente. El efecto de FKBP52 fue revertido por cotransfección con FKBP51. Con el fin de evaluar respuestas endógenas, se estudió la secreción de IL-6 (por ELISA) y la activación de MMP-2 (zimografías) en células BeWo estimuladas con PMA. Nuevamente, FKBP52 aumentó tanto la secreción de IL-6 como la actividad proteolítica de MMP-2 en más de 200% (p<0,003) siendo ambos efectos significativamente inhibidos por FKBP51 (p<0,05). La pre-incubación con FK506, macrólido inhibidor de la actividad peptidilprolil-isomerasa (PPIasa) de las FKBPs, así como la transfección con mutantes puntuales de FKBP52 sin actividad PPIasa (FKBP52F67Y y FKBPP52 F130Y), bloquearon el efecto estimulador de FKBP52. Concluimos que FKBP51 y FKBP52 modulan a AP-1 en forma contrapuesta, y que la acción estimulante de FKBP52 requiere de su actividad de PPIasa. Ambas FKBPs actuarían de manera concordante en respuestas biológicas mediadas por NF-kB y AP-1.

512 (510) EXPRESIÓN ALTERNATIVA DE LOS ARN MENSAJERO DE INTEGRINA BETA 1 EN LA GLÁNDULA MAMaría

Martin Garcia Sola[1]; Julian Naipauer[1]; Ayelen Santamans[1]; María Victoria Medina[1]; Daiana Sapochnik[1]; María Laura Blengini[1]; Martin Abba[2]; Edith Kordon[1]; Omar Coso[1]
IFIBYNE[1] CINIBA-FCM-UNLP[2]

Las integrinas son receptores de la superficie celular que juegan un papel crítico en el desarrollo normal y tumoral de los tejidos. Hemos reportado que el ARN mensajero (ARNm) que codifica para la subunidad β1 de integrina (Itgb1) posee una señal y sitio de corte y poliadenilación alternativa que produce una isoforma corta del ARNm (Itgb1-C)., 578 pares de bases más corta que la ya conocida (Itgb1-L). A diferencia de Itgb1-L, Itgb1-C no presenta en su 3'UTR, ni motivos ricos en AU ni secuencias blanco para ARNs pequeños (microRNAs o miRNAs) Los niveles de expresión para cada isoforma de ARNm de Itgb1 están determinados, al menos en parte, por el uso alternativo de estas señales durante los diferentes estadíos del desarrollo de la glándula maMaría. El microRNA 29 (miR-29) es representativo de una familia de miRNAs muy estudiados en la glándula maMaría. Hemos encontrado que el miR-29 posee secuencia blanco en Itgb1-L y no en Itgb1-C.

Nos proponemos observar si la modulación de miR-29 modifica la expresión de las distintas isoformas de Itgb1 y sus implicancias fisiologicas. Se moduló tanto de manera transitoria como de manera estable las cantidades de miR-29 en células HC11 para despues medir por medio de qRT-PCR las calidades y cantidades de ARNm de Itgb1. Los resultados aquí mostrados indican que las cantidades de miR-29 alteran diferencialmente la expresión de las distintas isoformas Itgb1 en las células maMarías HC11. Específicamente encontramos que la represión de la expresión de miR-29b resulta en la inducción de Itgb1. Además, la generación de líneas estables que sobreexpresan el miRNA sugiere la existencia de mecanismos de regulación intrínseca que mantendrían las cantidades fisiológicas de miR-29 intracelulares. Estos datos muestran por un lado un rol para miR-29 en la regulación de la expresión génica en glándula maMaría y por otro la posible existencia de un sistema de censado y autorregulación de este microRNA.

513 (512) PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR OXER1 EN LA PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN DE CÉLULAS ESTEROIDOGÉNICAS H295R

María Isabel Neuman[12]; Maríana Muñoz[1]; Fabiana Cornejo Maciel[12]
Facultad de Medicina[1] INBIOMED[2]

El OxeR1 es un receptor de membrana acoplado a proteína G, mediador de las acciones del 5-oxo-ETE, 5-HETE y 5-HpETE, productos del metabolismo del ácido araquidónico a través de la 5-lipoxigenasa. En células esteroidogénicas, estos compuestos son necesarios para la activación de la esteroidogénesis. En células de la línea H295R, células adrenocorticales esteroidogénicas de origen humano, detectamos la presencia del ARNm y proteína del OxeR. El receptor participa en la regulación de la producción de esteroides en células de Leydig y adrenocorticales, a través de vías dependientes e independientes de AMPc. Otros autores han postulado que 5-oxo-ETE es un potente activador de la migración en neutrófilos humanos mediado por su receptor y de la proliferación de células tumorales de próstata. En el presente trabajo analizamos el rol del receptor OxeR1 sobre la migración y la proliferación en las células H295R. Para ello utilizamos las línea H295R-OxeR1 (Ox), que sobreexpresa el OxeR1 de forma estable, y H295R-vacío (V) como control. La proliferación se cuantificó en diferentes condiciones de número de células y tiempo de cultivo por la técnica de cristal violeta, en células V y Ox. Se muestran los resultados, en unidades arbitrarias, como media ± SEM, para 120000 células iniciales luego de 48 hs de cultivo: V 0,028 ± 0,004; Ox 0,06 ± 0,01 ($P < 0,01$ vs V). El tratamiento de los cultivos de células Ox con Zileuton, inhibidor de la 5-lipoxigenasa, produjo una disminución de la proliferación: 0,04 ± 0,01 ($P < 0,05$ vs Ox). La migración se evaluó cuantificando el tamaño de una herida luego de 24 hs de producida. Se muestran los resultados, en unidades arbitrarias como media ± SEM: V control 18 ± 2; Ox + 5-oxo-ETE 33 ± 5 ($P < 0,05$). Por lo tanto, la sobreexpresión del OxeR1 aumentó significativamente tanto la proliferación, proceso dependiente de la 5-lipoxigenasa, como la migración.

514 (542) EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA EXPOSICIÓN DE LA SECUENCIA BLANCO DEL MIR-29 EN EL MRNA DEL ONCOGEN RAC3

Daniel R Rabinovich[1]; Cintia Cevallos[1]; Pablo Nicolás Fernández Larrosa[2]
Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA. INBIRS[1] IDIM-CONICET[2]

Los miRNAs son RNAs regulatorios de pequeño tamaño, capaces de unirse al 3'UTR de los mRNAs interfiriendo con su traducción y regulando la expresión de los genes a nivel post-transcripcional. Previamente, hemos analizado *in silico* el rol de la temperatura en la modulación del plegado de los mRNAs virales (HIV-1), permitiendo la hibridización de miRNAs, los cuales actuarán promoviendo la degradación de dichos mRNA virales. Por otra parte, algunos miRNAs participan en la regulación del desarrollo tumoral. RAC3 es un oncogén cuya sobreexpresión en tumores juega un rol clave en el desarrollo tumoral, pero que además se encuentra regulado en diferentes etapas del mismo. El objetivo de este trabajo es el estudio *in silico* del efecto de la temperatura en el plegado del mRNA de RAC3 y la exposición a miRNAs codificados en el genoma humano. La secuencia del 3´UTR de RAC3 se obtuvo de GenBank y las secuencias de los miRNAs descriptos en miR-Base. Los software utilizados para dicho análisis fueron: RNAhybrid, mFOLD 2.3 y Ensemble calc en UNAFOLD. Se analizó *in silico* para la secuencia de RAC3 las regiones que se desapareaban con el aumento de la temperatura y si se exponía una secuencia blanco para algún miRNA descrito. Además, se calculó el DGº correspondiente al plegado en la zona de complementariedad para el par miRNA-gen. Se encontraron varias secuencias del mRNA de RAC3 que se exponían a 45°C (y que permanecían apareadas a 37°C), pero una de ellas (región 2314 a 2320) exponía una secuencia complementaria al miRNA-29, favoreciendo su hibridización. Estos resultados *in silico* sugieren un rol de la temperatura en la modulación del plegado del mRNA de RAC3 favoreciendo la exposición de secuencia blancos de miRNAs (como es el caso analizado del miR-29), que tienen un rol descrito en la regulación del desarrollo tumoral. Este fenómeno podría ser relevante en episodios de fiebre o pirogénesis local (producto a inflamación) y como aplicación terapéutica en el futuro.

515 (561) EFECTO DEL CALCIO Y DEL LITIO SOBRE LA LONGITUD DEL CILIO PRIMARIO EN CÉLULAS EPITELIALES RENALES LLC-PK1

Paula Perez[1]; Maríano Smoler[12]; María Del Rocio Cantero[12]; Horacio Cantiello[12]
Fac. de Odontologia[1] CONICET[2]

El cilio primario (CP) es una organela históricamente considerada un apéndice vestigial de células eucariontes. Recientemente se han demostrado funciones sensoriales para el CP, cuya disfunción está asociada a enfermedades conocidas como "ciliopatías", como las poliquistosis renales autosómica dominantes y recesivas. Estudios previos indican que la policistina-2 (PC2), canal catiónico TRP no selectivo permeable al Ca^{2+}, presente en el CP de células epiteliales renales, regula su función. En el presente estudio, investigamos el efecto de distintas maniobras que modificarían la función de la PC2 sobre la longitud del CP en células LLC-PK1. Estas células se mantuvieron en cultivo en medio DMEM suplementado con FBS (3%) a 37°C y atmósfera de CO_2 hasta confluencia. Las placas fueron divididas en cuatro grupos, control (grupo 1) incubado en medio sin suplementos y grupos 2, 3 y 4 incubados en medio suplementado con $CaCl_2$ (5 mM), LiCl (10 mM) o amiloride (200 µM) durante 18 hs, respectivamente. Posteriormente, se realizó inmunohistoquímica con marcación priMaría de anticuerpo anti-tubulina acetilada (1:100) para la visualización del CP. Las células fueron observadas mediante microscopio invertido de fluorescencia (Olympus IX71), capturadas por video cámara (Hamamatsu Photonics) y procesadas a fines de cuantificar la longitud del CP. Las células del grupo 2, tratadas con $CaCl_2$ mostraron una reducción del 45 ± 2.4% en el largo del CP respecto del control ($p<0.001$). Un efecto análogo se observó en las células del grupo 4, en presencia de amiloride (48 ± 6.0%, $p<0.001$). Por el contrario, el LiCl produjo un aumento significativo en la longitud ciliar respecto del grupo control (68 ± 11%, $p<0.001$). La modificación del largo del CP producida por LiCl y $CaCl_2$ en las células LLC-PK1 es consistente con lo predicho por estudios anteriores de nuestro laboratorio (Cantero, BJ, 2011) y estudios actuales que se están llevando a cabo respecto de la regulación de la PC2 por Ca^{2+} externo.

516 (652) MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN EL EFECTO ANTIAPOPTÓTICO DEL 17β-ESTRADIOL Y LA TESTOSTERONA EN CÉLULAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO

Anabela La Colla; Lucía Pronsato; Lorena Milanesi; Andrea Vasconsuelo
INBIOSUR

La pérdida de masa y fuerza muscular es una condición frecuente durante la vejez, conocida como sarcopenia. Aunque el mecanismo molecular subyacente a esta patología no está totalmente esclarecido, existen evidencias que asocian la pérdida de miocitos en la adultez con la apoptosis. La sarcopenia ha sido relacionada al déficit de hormonas sexuales observado en adultos mayores. Estudios de nuestro grupo han demostrado que tanto la Testosterona (T) como el 17β-estradiol (E2) protegen a nivel morfológico, fisiológico, bioquímico y molecular de la apoptosis inducida con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en la línea celular de músculo esquelético murino C2C12. Estas células expuestas a H_2O_2 representan un fenotipo similar al músculo envejecido, constituyendo una herramienta útil para el estudio de la sarcopenia. El objetivo de este trabajo es profundizar el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la inducción de la apoptosis por H_2O_2 y en la acción antiapoptótica de ambos esteroides en células musculares. Hemos observado que el tratamiento con H_2O_2 induce la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTm), la activación de p53 e incrementa los niveles de ARNm de p66shc, su fosforilación y translocación a mitocondria donde ejerce su rol apoptótico. Paralelamente, dicho tratamiento también induce la activación/fosforilación de JNK, PKD, PKCθ, PKCδ y PKCβI, actuando algunos de éstos componentes *upstream* de la vía de p66Shc en la cascada apoptótica, no observándose la inducción de PKCα/β2. El tratamiento con T o E2 previo a la inducción de apoptosis, reduce la apertura del PPTm y los niveles de expresión y/o fosforilación de las proteínas evaluadas. Estos resultados concuerdan con el efecto que ambos esteroides ejercen sobre el músculo y aportan conocimiento sobre los mecanismos moleculares responsables de la sarcopenia asociada al envejecimiento, dándole un potencial rol a cada hormona en futuras estrategias terapéuticas.

122 (6) LA ESTIMULACIÓN HORMONAL POR ANGIOTENSINA II PROMUEVE LA LOCALIZACIÓN DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES A TRAVÉS DE MITOFUSINA 2 EN LA ESTEROIDOGÉNESIS

Katia Estefania Helfenberger; Ana Fernanda Castillo; Ana Zulma Fiore; Ernesto J. Podesta; Cecilia Poderoso
INBIOMED Departamento de Bioquímica Humana Facultad de Medicina UBA

En tejidos esteroidogénicos la mitocondria es la organela en la cual se produce el paso limitante en la regulación de la síntesis de esteroides, el transporte de colesterol de la membrana mitocondrial externa a la interna. En nuestro laboratorio hemos demostrado en células de Leydig, que este proceso necesita de la localización y activación de PKA/MEK/ERK en la mitocondria para que se produzca la fosforilación y activación de la proteína mitocondrial StAR, que regula el transporte de colesterol. La correcta localización mitocondrial de StAR depende de la presencia de Mitofusina 2 (Mfn2), proteína clave en la fusión mitocondrial, en células de Leydig MA-10 y en células adrenocorticales humanas. No se ha descripto la participación de Mfn2 en la compartimentalización de quinasas en la respuesta hormonal mediada por Angiotensina II (Ang II). Por eso, el objetivo principal del presente trabajo es estudiar el efecto de Ang II sobre la localización de quinasas claves en la esteroidogénesis y el rol de Mfn2 en este proceso, en células adrenocorticales humanas (H295R). La Ang II promueve la activación por fosforilación de MEK (quinasa río arriba de ERK) en la mitocondria en células H295R, lo cual se asocia con la translocación y activación de ERK mitocondrial en forma transitoria luego de la estimulación hormonal. Hemos detectado que la PKC epsilon también se localiza en mitocondria luego del estímulo con Ang II. Demostramos que la correcta localización de estas proteínas en la mitocondria depende de la expresión de Mfn2 estimulada hormonalmente. Hemos observado que la proteína Drp1, clave en la fisión mitocondrial, se localiza en mitocondria luego de la estimulación por Ang II. Estos resultados resaltan la importancia de la fusión/fisión mitocondrial mediada por diferentes vías de transducción de señales en la localización subcelular de proteínas claves en la esteroidogénesis.

ONCOLOGÍA 7

518 (36) GALECTINA-8 Y ALCAM ("ACTIVATED LEUKOCYTE CELL ADHESION MOLECULE", CD166) ESTABLECEN UNIONES HETEROFÍLICAS EN LA SUPERFICIE DE CÉLULAS TUMORALES MAMaríaS

Fátima Ferragut[1]; Candelaria Bracalante[1]; María F. Troncoso[1]; Carlota Wolfenstein-Todel[1]; Emilio L. Malchiodi[2]; Gabriel A. Rabinovich[34]; Marisa Fernandez[2]; María T. Elola[1]
IQUIFIB (CONICET-UBA). FFYB. UBA[1] IDEHU (CONICET-UBA)-Cátedra de Inmunología. FFyB. UBA.[2] IBYME-CONICET.[3] FCEyN. UBA.[4]

Galectina-8 (Gal8) es una lectina con funciones tanto procomo anti-adhesivas. En estudios previos, describimos un nuevo ligando de Gal8, ALCAM ("*activated leukocyte cell adhesion molecule*", CD166), demostrando la interacción glicano-específica entre la lectina y el ectodominio glicosilado de ALCAM mediante "resonancia plasmónica de superficie" (RPS) empleando un equipo BIAcore. En este trabajo, nos propusimos: 1- Evaluar las interacciones físicas entre Gal8 y células tumorales maMarías controles o silenciadas para ALCAM mediante RPS; 2- Estudiar la dependencia de glicanos en las mencionadas interacciones físicas mediante RPS; 3- Analizar la influencia del eje Gal8/ALCAM en la adhesión célula-sustrato en células tumorales maMarías controles o silenciadas para ALCAM; 4- Examinar la dependencia de glicanos en la adhesión célula-sustrato en células tumorales maMarías controles o silenciadas para ALCAM. Se utilizaron células maMarías tumorales MDA-MB-231 silenciadas para ALCAM (MDA-shALCAM) con un lentivirus (LV) shRNA específico y dichas células controles (LV control). A los efectos de evaluar la adhesión célula-sustrato, se efectuaron ensayos de adhesión *in vitro* de células MDA-shALCAM y controles en placas recubiertas con Gal-8 (0-3 μM) como sustrato, mediante tinción con cristal violeta y lectura a 595 nm. Nuestros resultados demostraron que: 1- Las células tumorales maMarías MDA-shALCAM tienen una capacidad disminuida de unión a Gal8 determinada por RPS ($p<0,05$); 2- La adhesión de células tumorales maMarías a sustratos de Gal8 disminuye aproximadamente un 50% al silenciar ALCAM endógeno (MDA-shALCAM: 44,67±13,87%; control: 100%, para 1 μM Gal8; $n=3$, $p<0,05$); 3- Los efectos evaluados son glicano-dependientes, ya que resultaron inhibidos por azúcares β-galactósidos bloqueantes de galectinas. En conclusión, existen uniones heterofílicas ALCAM-Gal8 que promueven la adhesión de células tumorales maMarías.

519 (78) LA PROTEÍNA CTBP1 Y EL SÍNDROME METABÓLICO DISMINUYEN LA ADHESIÓN CELULAR EN CÉLULAS TUMORALES MAMaríaS

Paula Lucía Farré; Nicolás Dalton; Juliana Porretti; Cintia Massillo; Georgina Scalise; Adriana De Siervi; Paola De Luca
Laboratorio de Oncología Molecular y Nuevos Blancos Terapéuticos - IByME – CONICET

El síndrome metabólico (SM) es un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer de mama y está asociado con el alto grado tumoral. Estudios previos de nuestro grupo muestran una posible explicación molecular para esta asociación. C-terminal Binding Protein (CtBP1) es un correpresor de supresores tumorales que presenta mayor actividad en condiciones de alta energía. Recientemente generamos un modelo de SM en ratones hembra *nu/nu* por alimentación crónica con una dieta grasa (37% grasa) que induce alteraciones consistentes con la aparición del síndrome. Demostramos que ambos, CtBP1 y SM, modulan la carcinogénesis maMaría y el crecimiento tumoral. La forma más severa de cáncer de mama es el metastásico y en este estadío la enfermedad suele resultar fatal. En este trabajo estudiamos el efecto de CtBP1 y el SM sobre la adhesión celular, proceso clave en el inicio de la metástasis. Encontramos que CtBP1 disminuye la adhesión de las líneas tumorales maMarías MDA-MB-231. Para evaluar el efecto del SM sobre la adhesión estas células, las incubamos con medio suplementado con suero obtenido de ratones con SM o de anima-

les control. El suero proveniente de animales con SM disminuyó la adhesión celular con respecto al control. Mediante RT-qPCR encontramos que in vitro CtBP1 disminuye la expresión de genes involucrados en el proceso de adhesión celular: ITGB4, COL17A, PRRS2 y FABP4. Interesantemente establecimos que *in vivo* CtBP1 y el SM regulan la expresión de genes que modulan la adhesión celular en xenotransplantes derivados de MDA-MB-231. Nuestros resultados demuestran por primera vez que CtBP1 y el SM disminuyen la adhesión de células tumorales de mama sugiriendo un rol para estos actores en el inicio de la metástasis tumoral maMaría. El esclarecimiento de los mecanismos asociados a CtBP1/SM en el cáncer de mama permitirá definirlos como nuevos marcadores para la prevención, seguimiento y terapia de esta enfermedad.

520 (260) EFECTO DEL SILENCIAMIENTO Y LA SOBREEXPRESIÓN DE RUNX2 EN LA LÍNEA TUMORAL DE MAMA HUMANA IBH-6 Y SU INTERACCIÓN CON EL EJE FGF2-FGFR2

María Sol Rodríguez; Isabel A. Lüthy; Claudia Lanari; Cecilia Pérez Piñero
IBYME

RUNX2 es un factor de transcripción que regula la expresión del FGFR2, a su vez FGF2 activa FGFR2 y regula la expresión de RUNX2. Demostramos que FGF2 estimula la proliferación celular activando a receptores hormonales en forma ligando independiente en modelos experimentales de cáncer de mama y observamos altos niveles de RUNX2 en tumores hormono independientes. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la sobreexpresión o el silenciamiento de RUNX2 en la línea de cáncer de mama humana IBH-6. La línea IBH-6 crece *in vivo* sin aporte hormonal exógeno, expresa receptores hormonales, FGFR2 y niveles basales de RUNX2. Se transfectaron las células con plásmidos específicos para silenciar a RUNX2 (shRUNX2) o para sobreexpresarlo (RUNX2), o con plásmido control (*Scrambled*, SC). El éxito de las transfecciones se confirmó por Western Blot. *In vitro:* Las células control y RUNX2 aumentaron su proliferación luego del tratamiento con FGF2 ($p<0.01$). IBH6 RUNX2 mostró una respuesta menor que el control frente al tratamiento con un inhibidor de FGFRs (Control $p<0.001$, RUNX2 $p<0.05$), lo cual podría deberse a que RUNX2 active otras vías de señalización independientes del FGFR2. Estas células también poseen una activación basal de la vía de ERK en comparación con el control (Western Blot). Por otro lado, la proliferación de IBH-6 shRUNX2 fue significativamente menor que el control y RUNX2 ($p<0.0001$). *In vivo:* Se inocularon 3.10^6 células s.c. en el flanco derecho de ratones NSG. Los tumores control y RUNX2 no mostraron diferencias en el crecimiento. Por otro lado, los tumores shRUNX2 fueron menos agresivos y más pequeños que los controles ($p<0.01$) y RUNX2 ($p<0.01$). Los resultados sugieren que RUNX2 es una proteína clave involucrada en la progresión tumoral. Además, suponemos que existe una regulación cruzada entre RUNX2-FGFR2 y actualmente estamos investigando cuales vías de señalización estarían involucradas en este proceso.

521 (347) ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN CÁNCER DE PRÓSTATA

Conrado Marco Olivieri; Federico Cantor*; Geraldine Gueron; Elba Vazquez; Javier Cotignola
IQUIBICEN/CONICET, Dpto de Química Biologica/FCEN, UBA

El cáncer de próstata (CaP) es el cáncer más frecuente en hombres. El diagnóstico se realiza mediante la cuantificación de los niveles séricos del Antígeno Prostático Específico (PSA), aunque tiene baja especificidad. La existencia de marcadores pronóstico también es limitada. El objetivo del trabajo es identificar marcadores diagnósticos y de progresión del CaP. Analizamos datos crudos de microarrays del repositorio público NCBI-GEO, los datos se procesaron utilizando el paquete Bioconductor para R. Determinamos la expresión génica diferencial (fold-change) mediante el test t-Student moderado entre tejidos normal de individuos sanos (n=17), tumor primario (n=144) y metástasis (n=22); el valor p de las comparaciones se ajustó mediante el método FDR (False Discovery Rate). Además se analizó el enriquecimiento de grupos de genes por Gene Ontology (GO). El análisis de expresión entre tejido normal y tumoral mostró expresión diferencial estadísticamente significativa en genes de las vías de: Respuesta a estímulos (ej: NR4A2, FOS, JUN), Citoesqueleto (ej: actinas, tropomiosinas, CRYAB), y Morfogénesis (actinas, FN1, DMD). En la comparación entre tumor primario y metástasis, se observaron alteraciones de expresión en vías de: Osificación y Desarrollo de hueso (ej: COL5A2, OPN, FHL2), Angiogénesis (ej: CAV1, HBB, ADM) y Respuesta a hormonas (ej: AR, CCND1, FOS, JUNB). Finalmente comparamos los tejidos normal y metástasis, y observamos expresión diferencial en vías de Migración (ej: ILK, VCL) y Adhesividad (ej: integrinas, proteasas) además de las mismas vías alteradas entre el tejido normal y tumor primario. Los resultados obtenidos muestran que durante la progresión del PCa se altera un gran número de vías de señalización. La identificación de las vías y genes involucrados podría ayudar a mejorar el diagnóstico y el pronóstico de la enfermedad; además de identificar posibles nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de los tumores prostáticos.

522 (532) EL SILENCIAMIENTO GENÉTICO DE P300 REDUCE LA VIABILIDAD Y AUMENTA LA MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR DE LA LÍNEA DE CARCINOMA MAMARIO MURINO LM3

María E Fermento; María E Villegas; Norberto A Gandini; Eliana N Alonso; Diego J Obiol; María J Ferronato; María M Facchinetti; Alejandro C Curino
Laboratorio de Biología del Cáncer, INIBIBB-CONICET, Bahía Blanca, Argentina

Los carcinomas mamarios son un grupo heterogéneo de tumores, que difieren en sus características, comportamiento y en la respuesta a la terapia, sugiriendo la necesidad de hallar nuevos marcadores moleculares. En este sentido, la evidencia muestra que p300 juega un importante papel en la tumorigénesis. Previamente hemos demostrado que la inhibición farmacológica de la función acetilasa de p300 aumenta su expresión y disminuye la viabilidad, migración e invasión celular de la línea de adenocarcinoma mamario LM3. Dado que estos resultados se obtuvieron con la modulación de la función acetil transferasa del cofactor y sabiendo que p300 tiene además otras funciones (scaffold, puente, ubiquitina ligasa) nos propusimos investigar el efecto del silenciamiento genético de p300 sobre la supervivencia, migración e invasión celular. Se obtuvieron clones de LM3 con sobreexpresión estable de un shRNA para p300 (LM3-p300NEG) y clones controles (LM3-CTRL) y se evaluaron los procesos de viabilidad, invasión y migración celular. Se confirmó la disminución de la expresión de p300 en las LM3-p300NEG respecto de LM3-CTRL mediante IF y RT-qPCR. Se observó una menor viabilidad (WST y conteo manual) y un aumento de células apoptóticas (TUNEL) en las LM3-p300NEG respecto a LM3-CTRL ($p<0,05$). Por otro lado, y contrariamente a lo observado con la inhibición de la función acetilasa, observamos una mayor migración (ensayo de la herida) y una mayor invasión (matrigel) en las células LM3-p300NEG respecto a las LM3-CTRL ($p<0,05$). En conclusión, la reducción de los niveles de p300 mediante silenciamiento genético inhibe la viabilidad celular a través de un aumento de apoptosis y aumenta la migración e invasión celular. Estos resultados sugieren la hipótesis que algunos de los procesos importantes en el desarrollo tumoral mamario son influenciados por la actividad acetilasa de p300 mientras que otros procesos son modulados por alguna de las otras funciones de p300.

523 (544) EFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE LA HEMOOXIGENASA EN CÁNCER DE MAMA SOBRE LA MODULACIÓN DE PROTEÍNAS QUE MOVILIZAN EL HIERRO CELULAR

Gisela Giorgi[1];Norberto Ariel Gandini[2]; Diego Javier Obiol[2]; Mara Marta Facchinetti[2]; Alejandro Carlos Curino[2]; Marta Elena Roque[1]
Laboratorio de Fisiología Humana, INBIOSUR,Universidad Nacional del Sur[1] CONICET-INIBIBB-Laboratorio de Biología del Cáncer[2]

La asociación entre el cáncer de mama (CM) y la desregulación del metabolismo del hierro descripta recientemente, abre nuevas perspectivas para ampliar el conocimiento de la etiología multifactorial de este tipo de tumores. Con este objetivo, se abordó el estudio de la activación de hemooxigenasa (HO-1) vinculada con la progresión de células tumorales y su relación con proteínas que movilizan el hierro celular. Materiales y Métodos: Líneas celulares murinas LM3 tratadas con hemina, activador farmacológico de HO-1; Modelos animales: a) Xenotrasplante con células MDA-MB-231 que sobreexpresan HO-1 (pcDNA3-HO-1); b) Trasplante singeneico de células LM3 +hemina; Biopsias Humanas (n=33). Inmunohistoquímica: DMT1, HO-1. Western Blot: DMT1 , RTf, Ferroportina (FPN), HO-1. Hierro: Tinción de Perl´s. Medición de especies reactivas del oxígeno (ROS); sonda 5,6-carboxi-2,7-dicloroflurescеína. Resultados: LM3 + hemina: disminuyó la expresión de DMT1 y RTf, sin cambios en FPN ($p<0,05$, Chi cuadrado), con aumento de ROS ($p<0,011$ Test de Student). Modelo murino singeneico: la activación de HO-1 se correlacionó con la disminución de DMT1 ($p<0,05$; Test de Student). Modelo de xenotrasplante: disminuyó la expresión de DMT1. En ambos modelos se observó aumento de los depósitos de hierro. En biopsias de CM se observó correlación indirecta en la inmunomarcación de HO-1 y DMT1 ($p=0,0462$; Test de Pearson) y correlación directa entre la expresión de HO-1 y los depósitos de Fe ($p=0,0006$; Test de Pearson). Concluyendo, el efecto antiproliferativo de la activación de HO-1 por hemina en CM, descripto previamente en nuestro laboratorio, podría explicar el aumento del hierro celular y justificar la inhibición de DMT1 y el aumento de ROS , probablemente por efecto de la acumulación de Fe^{3+}

524 (545) IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE PROGRESIÓN TUMORAL EN CÁNCER DE ENDOMETRIO

María Abascal[1]; Ma. Jose Besso[1]; Marina Rosso[1]; Ma. Victoria Mencucci[1]; Laura Furlong[2]; Ezequiel Lancuza[3]; Martin Abba[3]; Monica Vazquez-Levin[1]
IBYME[1] Hospital del Mar Medical Research Institute (IMIM)[2] Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas, Facultad de Ciencias Médicas, Universid[3]

Introducción: El Cáncer de Endometrio (CE) es la neoplasia ginecológica más común en occidente, con una incidencia de 15-20/100.000 mujeres/año. Cadherina Epitelial (*CDH1*/CadE) es una molécula de adhesión celular cuya expresión se altera durante la progresión tumoral en el CE. Para mejorar el diagnóstico/seguimiento del CE, es necesario identificar genes/proteínas alterados que permitan su detección de forma sensible, específica y reproducible (biomarcadores). Objetivo: Implementar estrategias orientadas a identificar biomarcadores relacionados a *CDH1*/ CadE para aportar al diagnóstico/seguimiento del CE. Metodología: 1) DisGeNET: Herramienta de Minería de Texto (MT) de asociaciones gen-enfermedad 2)HIPPIE: Herramienta que integra datos de interacciones proteína-proteína (IPP) 3) InSilicoDB: Repositorio de datos de microarreglos moleculares y "RNA-seq" 4) R Bioconductor: Herramienta para análisis de datos genómicos 5) Tratamiento de células de CE Hec1A con ARNi pequeño de CadE y agentes transformantes. 6) Análisis de expresión por qPCR. Resultados: Se hallaron por TM 34 genes, además de *CDH1*, reportados como potenciales biomarcadores en CE, que se relacionaron con 1370 proteínas mediante herramientas de IPP. Se seleccionaron como candidatos las proteínas relacionadas a *CDH1* y a los restantes 34 biomarcadores encontrados por MT (45/1370). Se analizaron los perfiles de expresión transcripcional de los 46 genes y *CDH1* en sets de datos de microarreglos. 24/46 genes analizados presentaron expresión diferencial ($p<0.01$) entre tumores y normales; 3/24 genes se encontraron diferencialmente expresados entre tumores grado 1 y 3 y fueron evaluados en modelos experimentales de progresión tumoral de CE obtenidos al tratar células Hec1A con agentes transformantes y con ARNi pequeños para modular la expresión de CadE. Conclusión: El uso de estrategias bioinformáticas y moleculares permitieron identificar potenciales biomarcadores asociados a la progresión tumoral en el CE.

525 (553) EXPRESIÓN DE UN MODULADOR NEGATIVO DE CADHERINA EPITELIAL ASOCIADO A LA PROGRESION TUMORAL Y A LA INVASION EN CANCER DE ENDOMETRIO

María José Besso[1]; María Florencia Abascal[1]; Marina Rosso[1]; Cristian Moiola[2]; María Victoria Mencucci[1]; Jaume Reventós[2]; Antonio Gil-Moreno[2]; Eva Colás[2]; Roberto Orti[3]; Alejandra Wernicke[3]; Monica Vazquez-Levin[1]
IBYME[1] Htal Vall d'Hebron (España)[2] Htal Italiano. CABA Argentina[3]

Introducción: El cáncer de endometrio (CE) es el 6to cáncer más común en las mujeres en todo el mundo. La infiltración miometrial (IM) es un evento clave en su diseminación y se asocia a un mal pronóstico (20-30% de los casos). La IM se correlaciona con una disminución de Cadherina Epitelial (CadE) y cambios en moléculas que favorecen la migración celular, pero estas entidades no han sido identificadas. En un modelo celular de IM de CE por sobreexpresión del factor de transcripción ETV5 reportamos la disminución de CadE y la expresión de Disadherina (Dys), glicoproteína asociada a invasión/metástasis en otros tumores. Objetivos: Evaluar la expresión de Dys en 1) células HEC1A tratadas con TGF-β1, citoquina inductora de invasión celular en CE; y en 2) biopsias de tumores no invasivos e invasivos de pacientes con CE. METODOLOGÍA: A) Modelo *in vitro*: células HEC1A tratadas por 72 h con TGF-β1 (10 ng/ml) y procesadas para estudios de PCR cuantitativa de ARNm (qRT-PCR) e inmunocitoquímica (ICQ). B) Muestras humanas: Biopsias de CE (n=38; clasificación FIGO tipo IA/no invasivo=23 y IB/invasivo=15) y 20 casos de CE de tumor superficial (T1) y frente invasivo (T2); (muestras pareadas) fueron procesadas para estudios de qRT-PCR de Dys. Las biopsias se clasificaron como Dys "*low*" y Dys "*high*" según la expresión de Dys. RESULTADOS: A) Las células HEC1A tratadas con TGF-β1 1) adquirieron un fenotipo tipo mesenquimal, evidenciado por su morfología tipo fibroblástica, niveles menores del ARNm de CadE (-45%) y pérdida de la proteína CadE de membrana y niveles mayores de ARNm de vimentina (+450%) y expresión aumentada de la proteína en las células, 2) un aumento en los niveles de ARNm de Dys (500%). B) Se detectó Dys "*high*", en 26% de los tumores IA y 54% en los IB. En línea con este resultado, Dys se encontró aumentada ($p<0,05$) en biopsias T2 comparado con T1. CONCLUSIÓN: La expresión de Dys se asocia a la transformación inducida por TGF-β1 y a la progresión tumoral del CE.

526 (558) LA INHIBICIÓN DE SURVIVINA SENSIBILIZA A CÉLULAS TUMORALES PANCREÁTICAS A LA ACCIÓN PRO-APOPTÓTICA DE LA GEMCITABINA

Cintia Y Mihalez; Tomás Lombardo; Susana N. Costantino; Daniela L. Papademetrio; Elida Alvarez
Cátedra de Inmunología-IDEHU, Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA-CONICET

Los adenocarcinomas ductales de páncreas (PDA) corresponden al 95% de los tumores del páncreas, con una sobrevida de 5 meses. En Argentina, ocupan el cuarto lugar en prevalencia. Si bien el índice de incidencia es bajo, la mortalidad en estos casos es muy elevada, debido a los múltiples mecanismos de resistencia que este tipo de tumores ponen en marcha frente al accionar de los quimioterápicos. El objetivo de este trabajo fue estudiar si la inhibición farmacológica de la expresión de survivina, una de las proteínas perteneciente a la familia IAP, sensibiliza a la línea tumoral PANC-1 frente a los efectos pro-apoptóticos de la gemcitabina (Gem) y establecer si este efecto es regulado por la autofagia. En primer lugar se demostró mediante western blot, que el tratamiento con Gem incrementa los niveles de survivina. Se analizó luego la capacidad de la Gem (10-1000µg/ml) de inducir apoptosis sola o post- tratamiento con el inhibidor YM155 en la línea PANC-1, mediante ensayos de TUNEL. Se observó un incremento del número de células apoptóticas con dosis de Gem de 100 y 1000µg/ml en combinación con 5nM de YM155, luego de 48 hs, respecto a los valores observados con las drogas utilizadas de manera independiente, alcanzándose valores de

células túnel + de (51,3±6,5)% (p<0,01) y (61,1±9,6)% (p<0,001), respectivamente. Junto con ello se observó que el tratamiento con YM155 disminuye el número de autofagosomas presente en esta línea celular. Nuestros resultados nos permiten concluir que survivina participa de los mecanismos de resistencia que las células tumorales pancreáticas ponen en marcha frente a la acción de la gemcitabina. Este efecto estaría mediado por un incremento del proceso autofágico manifestándose el rol dual de esta proteína en los procesos de muerte y sobrevida que remarcan la interrelación entre apoptosis y autofagia.

527 (572) DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE ANÁLOGOS DEL CALCITRIOL CON UN ANILLO OXOLANO EN SU CADENA LATERAL

Andrea Martínez Domínguez[1]; Hugo Santalla[1]; Marcos Lois[1]; María Julia Ferronato[2]; Diego Javier Obiol[2]; Generosa Gómez[1]; Yagamare Fall[1]; Alejandro Carlos Curino[2]; María Marta Facchinetti[2]
Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Vigo, España[1] Laboratorio de Biología del Cáncer, INIBIBB- CONICET, Bahía Blanca, Argentina[2]

El 1a,25-dihidroxivitamina D3 (calcitriol) presenta acciones antineoplásicas en varios tipos de cáncer pero su utilidad como agente antitumoral es limitada debido a su actividad hipercalcemiante. Se han sintetizado diversos análogos del calcitriol en búsqueda de alguno que demuestre actividad antitumoral sin producir efectos calcémicos. El objetivo de este trabajo es el diseño y síntesis de nuevos análogos del calcitriol con un anillo oxolano en la cadena lateral y su posterior evaluación biológica en ensayos de calcemia y de viabilidad y migración celular, comparando los efectos de los mismos con los ejercidos por el calcitriol. Los análogos AM-27, AM-28, ZG-610, ZG-611, AM-122, AM-123, AM-86, AM-93 se sintetizaron poniendo a punto una ruta sintética que parte como sustrato inicial del Diol de Inhoffen-Lythgoe y que permite obtener intermedios sintéticos clave, dándonos acceso a un abanico de pares de epímeros de análogos del calcitrol con un anillo oxolano en su cadena lateral de una manera rápida, versátil y con buenos rendimientos. Se evaluó la actividad hipercalcemiante de los nuevos análogos utilizando ratones CF1, a los cuales se les administraron intraperitonealmente dosis de 5 µg/kg peso diariamente durante 4 días. Ninguno de los análogos generó hipercalcemia a la dosis ensayada (ANOVA, p>0,05). Se observó una disminución de la viabilidad celular de la línea HCT116 (carcinoma colorrectal) con AM-86 (ANOVA, p<0,001) y ZG-610 (p<0,05) y una reducción de la migración celular con AM-86 (p<0,05), ZG-610 (p<0,05), AM-123 (p<0,001) y AM-93 (p<0,01). En la línea celular LM3 (adenocarcinoma mamario) los análogos AM-86, ZG-610 y AM-122 ensayados hasta el momento no demostraron poseer efecto en la migración celular. En conclusión, los resultados sugieren que la modificación de la cadena lateral del calcitriol con un anillo oxolano genera derivados que no inducen hipercalcemia, algunos de los cuales demuestran ejercer efectos antitumorales.

528 (574) EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ÁCIDO RETINOICO (ATRA) SOBRE CRECIMIENTO Y LA PROGRESIÓN MALIGNA, EN CÉLULAS TUMORALES MAMaríaS HUMANAS CON SOBREEXPRESIÓN DE DISTINTAS ISOFORMAS DE LA PROTEÍNA QUINASA C (PKC)

María Ines Diaz Bessone; Damian Emilio Berardi;Stefano Cirigliano; Carolina Flumian; Elisa Bal De Kier Joffe; Laura Todaro; Alejandro Urtreger
Inst de Oncologia

Las enzimas PKC constituyen una familia de serina-treonina quinasas que controlan numerosas funciones celulares, como el crecimiento, apoptosis y transformación maligna, mientras que el sistema retinoideo se encuentra ampliamente implicado en diferenciación.En este trabajo nos propusimos determinar el efecto del tratamiento retinoideo sobre características asociadas a la progresión tumoral en las células maMarías tumorales humanas MDA-MB231 y T47D que sobreexpresan PKCα o PKCδ.Ninguna de las isoformas de PKC alteró la capacidad proliferativa de las células MDA-MB231 ni T47D in vitro (TDP: 18,6±0,8 y 19,2±0,4 hs resp). Al evaluar el efecto del ATRA, observamos que las líneas derivadas de T47D responden disminuyendo su capacidad proliferativa, pero las T47D-PKCα en forma más pronunciada (TDP: 27,4±0,7 hs). Las líneas derivadas de MDA-MB231 no respondieron al tratamiento retinoide. Al evaluar el ciclo celular por citometría de flujo observamos que el ATRA induce un arresto en la fase G1 únicamente en la sublínea T47D-PKCα.Finalmente analizamos la regulación transcripcional de los genes blanco del ácido retinoico mediante ensayos de genes reporteros. Pudimos observar que tanto las sublíneas de T47D como las derivadas de MDA-MB231 respondían al ATRA aumentando la actividad de los sitios de respuesta al ácido retinoico.Como algunos de los efectos de los retinoides están dados por la trans-represión de sitios AP1, los mismos se evaluaron mediante ensayos de genes reporteros. Pudimos determinar que en las sublíneas de T47D hay una disminución de la actividad AP1 al ser tratadas con ATRA, no así en las sublíneas de MDA-MB231.Nuestros resultados sugieren por un lado que la sobreexpresión de PKCα podría sensibilizar al tratamiento retinoide, lo que se correlaciona con lo observado previamente por nuestro grupo en líneas murinas. Por otro lado, la falta de respuesta al tratamiento retinoide de las MDA-MB231 estaría dada por la falta de trans-represión de los sitios AP1.

529 (583) TERAPIA FOTODINÁMICA CON ACIDO 5-AMINOLEVÚLICO EN CULTIVOS TRIDIMENSIONALES DE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE PULMÓN

Haydee Fukuda[1]; María Julieta Teijo[1]; Rp Meiss[3]; M Del C Martinez[2]; Am Del C Batlle[1]
CIPYP-CONICET,UBA[1] Departamento de Química Biologica, FCEN, UBA[2] Instituto de Estudios Oncològicos, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina[3]

La Terapia fotodinámica (TFD) de tumores es un procedimiento terapéutico mínimamente invasivo de citotoxicidad selectiva hacia células malignas. La acción conjunta de un agente fotosensibilizante (FS) y luz genera una serie de reacciones fotoquímicas que producen la muerte celular. La administración de ácido 5-aminolevúlico (ALA), induce la acumulación de porfirinas fotoactivas. Sembrando 5x10^4 cél/ml (A549, adenocarcinoma de pulmón humano) sobre agar 3%-RPMI (1:1) a los 7 días se obtuvieron esferoides multicelulares (EMCs) compactos (100-700 µm), modelo 3D útil para estudios independiente de la vasculatura. Incubando 3h con ALA 1mM se acumularon 0,09±0,1 pg porf/cél distribuidos uniformemente en los distintos planos del esferoide (microscopía confocal); se irradiaron con 2 tubos fluorescentes y 1h despues se observo desprendimiento de células muertas, disrupción de la membrana y núcleos condensados. La activa proliferación celular (marcación con Ki67) de los EMCs no tratados, se redujo luego de la TFD a un cordón de células proliferativas en la periferia y escasa marca hacia el interior de la estructura. La condición hipóxica basal en los EMCs no tratados mostro un perfil heterogéneo de localización nuclear de HIF1-α que se incremento con una dosis lumínica baja (5 min) y explica la menor generación de ROS comparada con la monocapa, signos de apoptosis disminuidos (condensación nuclear, liberación de Cit c, despolarización mitocondrial, activación de caspasa-3, Annexina) e indicios de necrosis y autofagia (expresión de Bcl-2 y LC3-II). La detección de ROS no fue significativamente diferente en presencia y en ausencia de antioxidantes de alto grado de protección (ascorbato y trolox, segun los cultivos en monocapa), pero por microscopia de fluorescencia se vio un efecto protector a nivel superficial en las capas externas de los EMCs (NA/BE), sugierendo que el fotodaño a los tejidos normales puede ser atenuado mediante la administración de agentes antioxidantes.

530 (586) EL TEJIDO ADIPOSO MAMARIO PROVENIENTE DE RATAS HIPOTIROIDEAS DISMINUYE LA PROLIFERACIÓN Y LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES MAMaríaS TUMORALES Y NO TUMORALES

Constanza Matilde Lopez Fontana; Leila Zyla; Flavia Eliana Santiano; Corina Verónica Sasso; Maríangeles Ávila Maniero; Virginia Pistone Creydt; Rubén Walter Carón
IMBECU

Tanto el hipo como el hipertiroidismo experimental modifican la incidencia, latencia y progresión del cáncer de mama (CaM) inducido en ratas. A fin de estudiar la participación del tejido adiposo como posible intermediario entre los estados tiroideos y el CaM, evaluamos cambios en la proliferación, adhesión y migración de células epiteliales tumorales y no tumorales maMarías incubadas con los medios condicionados (MCs) de tejido adiposo abdominal (TAA) y mamario (TAM) provenientes de ratas hipotiroideas (HypoT) y eutiroideas (EUT) con tumores mamarios inducidos. Ratas hembras Sprague-Dawley fueron tratadas con una dosis de DMBA (15mg/rata) a los 55 días de edad y divididas en dos grupos: EUT, n=10 e HypoT (0.01% PTU en el agua de beber), n=10. Los animales fueron sacrificados cuando el volumen tumoral alcanzó los 1000 mm^3 o al final del experimento (día 200 post DMBA). Se extrajeron fragmentos de TAA y TAM de ambos grupos de animales, se incubaron por 24 hs con medio M199, y se recolectaron los MCs. Líneas celulares maMarías tumorales (MCF-7 y MDA-MB-231) y no tumorales (MCF-10A), se incubaron con los MCs y se midió proliferación por MTT, migración por cicatrización de la herida y cambios en la adhesión sobre placas expuestas previamente a los diferentes MCs. La concentración proteica de los MCs se determinó por BCA. Los MCs-TAM de ratas HypoT expresaron menor cantidad de proteínas totales que los MCs-TAA ($p<0,05$). Así mismo, las líneas celulares tumorales y no tumorales incubadas con MCs-TAM de ratas HypoT proliferaron y migraron significativamente menos que aquellas incubadas con MCs-TAM de ratas EUT ($p<0,05$, ANOVA de 1 factor y Tukey test). No observándose estos cambios en las líneas celulares incubadas con MCs-TAA. Concluimos que el hipotiroidismo inducido en ratas produce modificaciones en la capacidad del tejido adiposo de secretar factores solubles que regulan la proliferación y la migración de células maMarías normales y tumorales.

531 (600) SCHWANOMATOSIS: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, MOLECULARES Y DIAGNÓSTICO

Marcela Ferrer[1]; Patricia Ciavarelli[1]; Irene Szijan[2]
División Neurocirugía HCJSM UBA[1] Cátedra de Genética - FFyB UBA[2]

La schwanomatosis es una condición que predispone al desarrollo de tumores de las células de Schwann intracraneales, espinales y periféricos. Tiene una incidencia aproximada de 1:40000 y el 15-20% son hereditarios. Los genes implicados son: SMARCB1, LZTR1 y NF2, todos supresores tumorales ubicados en el cromosoma 22. El modelo tumorigénico es de 4 eventos en 3 pasos, siendo los mutaciones germinales solo en SMARCB1 y LZTR1. El objetivo es la búsqueda de datos diagnósticos en pacientes con tumores presuntivamente schwanomas. Se estudiaron 18 pacientes por medio de signos clínicos, RMN y métodos moleculares. La edad al diagnóstico varió desde 4 a 72 años. Los síntomas fueron: dolor, trastornos en la marcha, pérdida de audición, etc, como resultado de la compresión de nervios por la masa tumoral. Cuatro pacientes tuvieron antecedentes familiares. Los signos y síntomas fueron variables, algunos (4) mostraron manchas "café con leche", uno tuvo escoliosis, ninguno presentó nódulos de Lisch o problemas visuales (propios de NF1). La presencia de schwanomas únicos o múltiples se observó en todos los pacientes, ubicados en plexo axilar, clavícula, retroperitoneal, médula espinal dorsal, muslos, etc. Once pacientes fueron sometidos a cirugías, sin secuelas. Los estudios moleculares fueron la secuenciación del gen SMARCB1 y NF2. El análisis completo del primero dio negativo en un paciente, en otros dos está en curso y en otro las secuenciación de NF2 dio negativo. Conclusiones: El número de pacientes diagnosticados en la Argentina fue elevado teniendo en cuenta la baja frecuencia de casos publicados internacionalmente. La localización de tumores fue muy variada abarcando cerebro, columna vertebral y miembros. El diagnóstico clínico es difícil debido a que los síntomas se comparten con otras enfermedades del grupo (NF1 y NF2). Por lo tanto es importante el diagnóstico molecular por medio del análisis de los genes involucrados.

532 (608) ESTUDIO FOTOTERAPEUTICO DE NANOPARTICULAS DE POLÍMEROS CONJUGADOS DOPADAS CON PORFIRINAS PARA SU IMPLEMENTACION EN TERAPIA FOTODINAMICA

Luis Ibarra[1]; Lorena Macor[2]; Gabriela Porcal[2]; Rodrigo Ponzio[2]; Rodrigo Palacios[2]; Viviana Rivarola[1]
Depto. de Biologia Molecular, Fac. de Cs. Exactas Fisicas y Naturales, Univ. Nac. de Rio Cuarto[1] Depto. de Química, Fac. de Ciencias Exactas y Naturales, Univ. Nac. de Rio Cuarto[2]

Introducción: La Terapia Fotodinámica (TFD) es una modalidad terapéutica contra el cáncer que involucra la destrucción de células tumorales inducida por la luz, las cuales fueron previamente tratadas con un agente fotosensibilizador. Nanopartículas (NPs) de polímeros conjugados han surgido recientemente y poseen características interesantes para ser aplicadas a TFD. Objetivos: - Evaluar la incorporación de Nps del polímero conjugado poli(9,9-dioctilfluoreno-altbenzotiadiazol) (F8BT) en líneas celulares normales y tumorales. - Evaluar el efecto fotodinámico de Nps de F8BT y Nps de F8BT dopadas con porfirina – Evaluar el mecanismo de muerte celular desencadenado luego de aplicar TFD. Materiales y métodos: Se sintetizaron Nps de F8BT estabilizadas con polímeros anfifílicos. Se realizó la caracterización de tamaño mediante microscopia de fuerza atómica. Los estudios de incorporación celular se realizaron mediante microscopia de fluorescencia y el efecto fotodinámico empleando la línea celular T98G (glioblastoma multiforme humano) y RAW 264.7 (macrófagos) a través de ensayos de viabilidad celular (MTT), citometria de flujo (anexina V / ioduro de propidio) y fragmentación de ADN. Resultados: Las NPs de F8BT poseen un diámetro promedio 55 nm, dicho diámetro no se modificó luego de la incorporación de una porfirina liposoluble. Se encontró que las Nps son capaces de sensibilizar la formación de $^1O_2$ a partir de la observación de la fosforescencia de $^1O_2$ a 1270 nm. Se demostró la incorporación de Nps en ambas líneas celulares siendo superior en los macrófagos. Las Nps no fueron citotóxicas en oscuridad. Luego de aplicar TFD con Nps dopadas con porfirinas se determinó el efecto citotóxico en ambas líneas celulares con la consiguiente muerte celular por apoptosis. Conclusión: Se pudieron sintetizar Nps de polímeros conjugados con interesantes propiedades para ser implementadas en TFD. Dicho efecto fue superador cuando se incorporó una porfirina en la síntesis.

533 (609) ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES RETINOIDEOS SOBRE EL COMPONENTE STEM/ PROGENITOR, EL POTENCIAL INVASIVO Y LA DISEMINACIÓN METÁSTASICA, DE LÍNEAS TUMORALES MAMaríaS MURINAS

Carolina Flumian;Stéfano M. Cirigliano; María Inés Diaz Bessone; Damian E. Berardi; Agustina Taruselli; Elisa Dora Bal De Kier Joffe; Alejandro Urtreger; Laura Beatriz Todaro
Instituto Ángel H. Roffo

Hemos descripto que la activación de los distintos receptores de acido retinoico (RARs) tiene un efecto contrapuesto en diversos procesos involucrados en la diseminación metastásica. En este trabajo nos propusimos evaluar si la activación de los RARs influye en el enriquecimiento del componente stem, en la invasión celular y en el potencial metastásico experimental *in vivo*.Utilizamos las líneas murinas tripe-negativas LM38-LP y 4T1 que difieren en el patrón de expresión de los receptores retinoicos (RARs). Los pre-tratamientos se realizaron con: ATRA (pan-agonista), AM (agonista RARa), AC (agonista RARb), BMS (agonista RARg). En ensayos de invasión en transwell/Matrigel se observó que tanto el ATRA como el AM disminuyeron la invasión de las células LM38-LP (ATRA 0,18±0,03; AM 0,34±0,09 vs. V 1±0,30; ANOVA *$p<0,05$) mientras que la aumentaron en las 4T1 (ATRA 3,77±0,21; AM 3,22±0,08 vs. V 1,00±0,16;

ANOVA *p<0,05). Los pre-tratamientos con AM o AC produjeron un aumento en el número de mamosferas priMarías en la línea LM38-LP (AM 378±47; AC 445±80 vs. Vehículo (V) 195±35, ANOVA *p<0,05). *In vivo*, el pre-tratamiento de las LM38-LP con AM580 o AC aumentó el número de nódulos pulmonares (AM Md 117 Rg[100-174], AC Md 143 Rg[86-314]vs. V Md 42 Rg[14-76], Kruskall Wallis *p<0,05) mientras que en 4T1 fue el BMS el que produjo un aumento de las metástasis (BMS Md 118 Rg[63-145] vs. V Md 42 Rg[14.76], Kruskall Wallis *p<0,05). En conclusión, la activación de RARa disminuye la capacidad invasora de las células LM38-LP mientras que la aumenta para las células 4T1. Esto concuerda con observaciones previas en las que la activación de este RAR disminuye otros parámetros *in vitro* asociados con la diseminación metastásica para las LM38-LP mientras que los aumenta para las 4T1. Sin embargo, el aumento del potencial metastásico observado en las células LM38-LP podría asociarse con el incremento en el número de mamosferas priMarías inducido por la activación de RARa o RARb.

534 (615) LOCALIZACIÓN Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNA C-FOS, Y CONTENIDO DE AP-1 EN MAMAS DE RATAS DURANTE EL DESARROLLO TUMORAL MAMARIO

Alicia Gutierrez[1]; Rosa Bergoc[3]; Lorena Sambuco[3]; Laura Alvarez[1]; Gabriela Martín[2]; Andrea Randi[1]
Laboratorio de Efectos Biológicos de Contaminantes Ambientales, Fac. Medicina, UBA[1] Laboratorio de Radioisótopos, Depto. Físico-Matemática, FFyB, UBA[2] Instituto de Inmunooncología, Crescenti[3]

En cáncer mamario c-Fos, un importante regulador del crecimiento celular cuya expresión y actividad es modulada por estrógenos, es el componente más estudiado del AP-1. Sin embargo actualmente se están estudiando las funciones citoplasmáticas de c-Fos. Desarrollamos un modelo de carcinoma mamario inducido en ratas por administración de N-nitroso N-metilurea (NMU). Objetivo: estudiar en glándula maMaría de rata a lo largo del proceso carcinogénico, así como en tumores mamarios desarrollados: a) proliferación celular por PCNA (inmunohistoquímica, IHQ), b) expresión y localización de c-Fos nuclear (c-FOSn) y citoplasmático (c-FOSc) (IHQ), c) expresión de AP-1 (Inmunoblot), d) activación del Receptor de Estrógenos α (REα) (inmunoblot). Ratas hembras fueron separadas en dos grupos: Control (C) y NMU, i.p. 50 mg/kg a 50, 80 y 110 días de vida (d) y se tomaron muestras a los 60, 90, 120 y 150 d. Resultados: Los niveles de PCNA aumentan en NMU desde los 60 d (667%) vs C. En tumores no diferenciados la marca es 150% mayor vs diferenciados. En C la expresión de c-FOSn aumenta a 90 d (185%) disminuyendo a los 120 d al valor inicial, cayendo a los 150 d (55%), mientras que el c-FOSc se mantiene estable y disminuye a los 150 d (75%). En cambio en NMU el c-FOSn aumenta a los 90 y 120 d (53, 87%), bajando a los 150 d (65%) y el c-FOSc disminuye desde los 120 d (58%). En tumores no diferenciados el contenido de c-FOSn es 270% mayor vs diferenciados, pero el c-FOSc es 40% menor vs diferenciados. Los niveles de proteína c-Fos asociados a fosfo-Ser69-cJun (AP-1) se incrementan con NMU (250%) a partir de 60 d, y la activación del Tyr537-REα aumenta a partir de 60 d (86%) en NMU vs C. Conclusión: En la mamas C se mantiene el contenido de c-FOSc, asociado a alta proliferación en el desarrollo mamario normal. Mientras que en NMU, el c-FOS se transloca al núcleo a lo largo del proceso carcinogénico, y se relaciona con el aumento de AP-1 y de la activación del REα.

535 (617) EL COMPLEJO LSD1/HOTAIR JUEGA UN IMPORTAN- TE ROL EN LA TRANSFORMACIÓN TUMORAL DE CÉLULAS CON CÁNCER DE MAMA

María Belen Mestre Gimenez; Juan Pablo Marquez Lara; Martin Alejandro Bruno
Univ. Catolica de Cuyo - Sede San Juan

La epigenética es la disciplina científica que estudia las modificaciones que afectan a la expresión de genes sin alterar la secuencia del ADN. Las modificaciones epigenéticas incluyen a la metilación del ADN, la modificación de histonas, y los ARN no codificantes. Los lncRNA (ARN no codificantes largos) son RNAs no codificantes de simple cadena, tienen una longitud mayor a 200 nucleótidos y participan en la regulación de numerosos procesos biológicos. Además, los lncRNA han sido implicados en distintos tipos de cáncer, ya sea actuando como supresores de tumores o como oncogenes. Se ha demostrado que HOTAIR, un lncRNA que participa en el silenciamiento de varios genes, se encuentra aumentado y asociado a metástasis en cáncer de mama. También se ha demostrado que LSD1, una demetilasa de histonas regulada por HOTAIR, está aumentada en cáncer de mama ER-negativo. La inhibición de LSD1 se está probando como terapia para el cáncer, y se ha encontrado que la desactivación de LSD1 con inhibidores como el TCP (tranylcypromine) disminuye el potencial oncogénico de células con Leucemia Mieloide Aguda. La determinación de la expresión de HOTAIR y su interacción con LSD1 en cáncer de mama proveen la base para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas. En nuestro trabajo se determinó la interacción de HOTAIR con LSD1 en líneas celulares con cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231) y se comprobó que el inhibidor específico de LSD1, LSD1 Inhibitor III, afecta esta interacción. La formación del complejo LSD1/HOTAIR podría participar en la transformación tumoral de las células. Para corroborar esto, se inhibió LSD1 y se determinó la proliferación celular, ya que la capacidad de proliferar es una característica de las células tumorales. Se observó una disminución en la proliferación después de inhibir LSD1, indicando que LSD1 y HOTAIR podrían participar en la transformación tumoral que sufren las células epiteliales de mama durante el desarrollo del cáncer.

536 (634) LA RADIACIÓN IONIZANTE REGULA LA ACTIVIDAD DE SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD) A NIVEL TRANSCRIPCIONAL EN CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE PULMÓN HUMANO

Andrea B. Acquier[1]; Horacio A. Blanco[3]; Alejandra B. Gorostizaga[2]; Cristina Paz[2]; Carlos F Mendez[1]
INBIOMED, Facultad de Medicina, UBA; Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología, UBA[1] INBIOMED, Facultad de Medicina, UBA[2] INBIOMED, Facultad de Medicina, UBA; Unidad de Alta Energía, Hospital de Oncología María Curie[3]

Las células cancerígenas que sobreviven a la terapia radiante se denominan radiorresistentes. La radiorresistencia es un fenómeno complejo basado en múltiples interacciones entre genes y proteínas que incluye, en algunos modelos, la sobreexpresión del receptor de EGF y de enzimas antioxidantes. El objetivo de este trabajo ha sido evaluar el efecto de la radiación ionizante (RI) sobre la expresión y actividad de SOD. Se emplearon células derivadas de adenocarcinoma de pulmón humano de la línea A549 y ^{60}Co como fuente de RI. Se determinó la expresión de las isoformas de SOD por RT-PCR, la actividad de SOD por un método colorimétrico basado en la inhibición de la autooxidación del pirogalol y la activación del factor nuclear kB (NF-kB) por luminiscencia luego de la transfección de las células con un plásmido conteniendo tres copias de la secuencia kB unidas al ADNc de luciferasa. La RI, en una dosis única de 2,5 Gy, produjo un incremento en la actividad de SOD que resultó significativo (p<0,01) a las 24 hs post irradiación (137±18; 165±12; 168±15 y 483±54 U/mg proteína para control, 15 min, 1 h y 24 hs post irradiación, respectivamente) y una activación de NF-kB (78±5; 90±8 y 98±9 U de luciferasa para control, 15 y 60 min post RI, respectivamente), mientras que la preincubación de las células con 5 µM de partenolide, inhibidor de NF-kB, disminuyó el efecto de la RI sobre la actividad de SOD (483±54 vs 294±21 U/mg proteína, p<0,05). La RI produjo un incremento significativo de la expresión del transcripto de SOD-1, un efecto observable 24 hs post irradiación, mientras que en condiciones basales se detectó la expresión de los transcriptos de SOD-1 y SOD-2, sin expresión de SOD-3 en las células A549. Nuestros resultados demuestran que la RI incrementa la actividad de SOD por un mecanismo a nivel transcripcional que involucra la inducción del gen de SOD-1 y la activación del factor de transcripción NF-kB.

537 (648) CAMBIOS EN EL INFILTRADO TUMORAL PROVOCADOS POR LA ADMINISTRACIÓN DE MIFEPRISTONA EN UN CARCINOMA MAMARIO MURINO SENSIBLE A ANTIPROGESTÁGENOS

Gonzalo Sequeira; Ana Sahores; Tomas Dalotto; Maríana Salatino; Claudia Lanari
Instituto de Biología y Medicina Experimental

El infiltrado tumoral sufre cambios durante el proceso de regresión, por esto la caracterización de los tipos celulares afectados podría constituir un factor pronóstico del éxito terapéutico. Utilizando citometría de flujo (FACS), nos propusimos identificar en un modelo murino las poblaciones celulares del sistema inmune derivadas de medula ósea (MO) dentro del microambiente tumoral mamario. Para esto, inoculamos de forma endovenosa (*ev.*) ratones NOD-SCID *gamma* (NSG) con MO de ratones BALB/c-GFP+, estableciendo un modelo de ratones NSG-MO-GFP+. A los dos meses, identificamos con microscopía confocal y FACS la presencia de células GFP+ en bazo y en MO de los ratones experimentales. Se inoculó el tumor mamario murino 59-2-HI sensible a antiprogestágenos de forma ortotópica en ratones repoblados. Cuando los tumores alcanzaron 50 mm^2 aprox. se administró mifepristona (MFP; 10 mg/kg/día o *pellet* 0,2 mg) para estudiar las modificaciones del microambiente tumoral con el tratamiento. Se analizaron las poblaciones GFP+ del estroma a los 3 y 6 días de tratamiento. Se observó un aumento en la población de células mieloides granulocíticas (CD11b+ Gr1+; $p<0,05$), en macrófagos intratumorales (CD11b+ F480+; $p<0,01$) y en linfocitos T CD8+ (CD8+; $p<0,01$) y una disminución en linfocitos T regulatorios (CD4+; CD25+; Foxp3+; $p<0,05$) en los tumores tratados con MFP respecto de los controles. No existieron diferencias en las curvas de crecimiento de los tumores tratados con MFP en los ratones NSG respecto de los NSG-MO-GFP+, lo que indica que la regresión inducida por la terapia endocrina sería independiente del sistema inmune. Sin embargo, los cambios observados en las poblaciones inmunes sugieren que la regresión tumoral inducida por MFP podría favorecer la reeducación de la respuesta inmune antitumoral. Además, logramos desarrollar un modelo murino experimental adecuado para el estudio del efecto de terapias sobre las células derivadas de MO en el microambiente tumoral.

538 (660) ANÁLISIS IN SILICO DE LA IMPORTANCIA PRONÓSTICA DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES ADRENÉRGICOS EN TUMORES DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA

Ezequiel Maríano Rivero[1]; Leandro Marcelo Martinez[1]; Carlos David Bruque[3]; Lucia Gargiulo[1]; Ariana Bruzzone[2]; Isabel Luthy[1]
IBYME[1] INIBIBB[2] ANLIS-Malbrán[3]

En estudios previos hemos asociado a los receptores adrenérgicos beta2 y alfa2 (B2-RA y A2-RA) con cambios en el crecimiento tumoral y en la proliferación y migración de células de cáncer de mama humano. Para determinar la relevancia pronóstica de estos receptores, analizamos *in silico* la asociación entre sus niveles de expresión en tumores primarios y datos clínicos provenientes de la base de datos de *microarray* GSE18229 del repositorio público GEO. Identificamos el *cut-off* óptimo para cada biomarcador teniendo en cuenta su asociación con el tiempo libre de enfermedad (DFS, menor p-value). La asociación con parámetros de pronóstico clásicos y con la recurrencia de la enfermedad se analizó por el test Exacto de Fisher. La asociación con el DFS y sobrevida acumulada (OS) se evaluó por curvas de sobrevida Kaplan-Meier analizadas mediante *Log-rank test* (Mantel-Cox). La independencia predictiva de cada biomarcador por test multivariado (*Cox Proportional Hazards Model*). El B2-RA y el A2a-RA están sobreexpresados en el subtipo *Claudin-Low* (CL, $p<0.05$). El A2a-RA además está disminuido en tumores *Basal-like* (BL, $p<0.05$). En los 291 tumores analizados, una alta expresión del A2a-RA se asoció a un aumento del DFS ($p=0.0012$) y de la OS ($p=0.0015$), resultando ser un biomarcador predictivo independiente para el DFS ($p=0.027$). Se observó una asociación entre una alta expresión del A2c-RA y la recurrencia de la enfermedad ($p=0.0467$). Ni la expresión del B2-RA ni la del A2b-RA se asociaron con DFS y OS al tomar la cohorte completa, pero una alta expresión de B2-RA se asoció con una disminución del DFS en tumores Luminales A ($p=0.0025$). Además, una alta expresión del A2b-RA se asoció con una disminución del DFS y OS ($p=0.021$ y $p=0.036$) en tumores de mal pronóstico (CL, BL, Her2-*Enriched* y Luminal B). En conjunto estos datos resaltan la relevancia de los RA en el cáncer de mama y los señalan como posibles biomarcadores y blancos terapéuticos para el tratamiento de esta enfermedad.

539 (667) CITOTOXICIDAD DE IMIQUIMOD: ESTRÉS CELULAR Y MUERTE EN CÉLULAS ENDOTELIALES MURINAS NORMALES VS TRANSFORMADAS COMO MODELO DE HEMANGIOMA

Rodrigo Rocco[1]; Hernán Reingruber[1]; Roberto Pozner[2]; Rosa Wainstok[1]; Adriana Cochón[1]; Silvina Gazzaniga[1]
Dpto. de Química Biológica-IQUIBICEN, FCEyN, UBA[1] Academia Nacional de Medicina[2]

El tratamiento de hemangiomas con Imiquimod (IQ), imidazoquinolina de uso tópico, es una alternativa terapéutica poco implementada para esta patología de piel. Sin embargo, demostró ser de gran eficacia en otras afecciones cutáneas. Independientemente de su capacidad inmunomoduladora, su mecanismo de acción sobre las células transformadas ha sido escasamente estudiado. Previamente hemos reportado que las células endoteliales transformadas H5V poseen una concentración letal (CL_{50}) de IQ menor que la correspondiente de endotelio normal 1G11 (SAIC 2014). Con el fin de analizar si se produce estrés celular y caracterizar el tipo de muerte se trataron ambas líneas con IQ (0-15 µg/ml) durante 2 y 24 hs. Al medir la actividad de la enzima antioxidante catalasa (parámetro relacionado con estrés oxidativo) se observó inhibición máxima a 1 µg/ml de IQ en H5V a las 2 hs post tratamiento. En 1G11 la inhibición fue máxima a 5 µg/ml, reflejándose el efecto selectivo de IQ. Con 24 horas de tratamiento, en ambas líneas celulares se observó una recuperación de la actividad de la enzima. Las evidencias tempranas de estrés no fueron acompañadas por alteraciones en el citoesqueleto de F-actina. El Análisis de Morfología Nuclear (NMA) a 24 hs en H5V mostró condensación nuclear ($\approx$ 45-65%), indicativo de apoptosis, en aquellas halladas en el sobrenadante a 5-10 µg/ml ($p<0,05$); mientras que las adheridas presentaron núcleos normales o con parámetros de senescencia (6-11%). En 1G11 la morfología nuclear fue normal y no se hallaron células en el sobrenadante. La marcación con ioduro de propidio/Anexina V-FITC fue coherente con el NMA mostrando valores de muerte similares. Estas observaciones implican que la apoptosis tanto como la senescencia en respuesta al estrés inducido por IQ, estaría limitando la proliferación de las células afectadas.

ENDOCRINOLOGÍA 5

540 (137) CAMBIOS METABÓLICOS INDUCIDOS POR NONYL- PHENOL Y FRUCTOSA DESDE LA POSTLACTANCIA EN RATAS MACHO ADULTAS

Yanina Alejandra Samaniego[1]; M.Cecilia Fornari[2]; Andres Giovambattista[3]; Silvia Carbone[1]; Roxana. Reynoso[1]; Carlos Reyes Toso[4]; Osvaldo J. Ponzo[1]
Laboratorio de Endocrinología - Dpto. de Fisiología. Facultad de Medicina. UBA[1] Laboratorio de Análisis Clínicos Bioalpha-Fornari[2] Unidad de Neuroendocrinología, Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE), La Plata[3] Unidad Académica 2, Dpto. de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA[4]

Objetivo: estudiar si la exposición crónica (postlactancia a adultez) a Nonylphenol (NP) provoca cambios metabólicos en ausencia y presencia de fructosa (F). Se administró NP 50 (NP50) y 100 (NP 100) mg/kg/d (v.o., días 21-70 de edad) a ratas Wistar macho (n= 10-15/grupo). La mitad de los animales de cada grupo recibieron F al 10% en agua de bebida. Se analizó glucemia

(G), acido úrico (AU), colesterol total (CT), HDL, LDL, triglicéridos (TAG), leptina (L), insulina (I). Resultados: AU: aumentó con NP50 y NP100 (C: 0,53±0,06, NP50: 0.97± 0,10, p<0.05; NP100: 1.05±0,06 p<0.001). No hubo diferencias en NP50F y NP100F vs CF (CF: 1.025±0.06, NP50F: 1.06±0.03, NP100F: 1.17±0.06) y entre los grupos NP y NP con F, en ambas dosis. TAG: no se modificaron en NP50 y NP100 vs C (C: 66.90±3.25, NP50: 72.27±4.70, NP100: 79.50±3.10). En NP100F aumentó (p<0.01) y en el NP50F no cambió vs CF (CF: 94.60±1.75, NP50F: 94.73±4.40, NP100F: 136.4±12.7). El tratamiento simultáneo con F y NP produjo aumento en los grupos NP50F (p<0.05) y NP 100F (p<0.001) (NP50: 72.27±4.70 vs NP50F: 94.73±4.40, NP100: 79.50±3.10 vs NP100F: 136.4 ± 12.7). HDL: disminuyó (p<0.001) con ambas dosis de NP (C: 41.93±2.40, NP50: 26.76±1.62, NP100: 30.86±1.62). El tratamiento con F descendió los niveles en NP50F (p<0.05) y NP100F (p<0.001) vs CF (CF: 37.17±1.97, NP50F: 28.83±1.79, NP100F: 24.95±1.24), y a su vez en NP100F respecto a su control (p<0.05). CT: descendió con NP50 (p<0.01) y NP100 (p<0.05) (C: 66.83±2.81, NP50: 55.07±2.87, NP100: 59.4±2.62). El tratamiento con F disminuyó los niveles en NP50F (CF: 63.47±2.8 vs NP50F: 55.0±2.49). No hubo cambios en el LDL, G y L. La I mostró tendencia no significativa al aumento en los grupos con CF y NP50F. La exposición crónica a NP produce modificaciones metabólicas en los animales expuestos postlactancia solo ó con fructosa, siendo este efecto más evidente en acido úrico, HDL y TAG. Dosis altas de NP potencian el aumento de triglicerdidemia inducido por fructosa

541 (229) ESTUDIO DE LA CORRELACIÓN ENTRE PROLACTINA, PROGESTERONA, VEGF Y LOS NIVELES DE PROLIFERACIÓN CELULAR DE LA GLÁNDULA MAMaría A LO LARGO DEL CICLO REPRODUCTIVO DE LAGOSTOMUS MAXIMUS (RODENTIA: CHINCHILLIDAE)

Clara Corso[1]; Sofia Proietto[1]; Pablo Ignacio Felipe Inserra[12]; Santiago Elias Charif[12]; Veronica Berta Dorfman[12]; Alfredo Daniel Vitullo[12]; Julia Halperin[12]
CEBBAD,Universidad Maimónides[1] CONICET[2]

La glándula maMaría (GM) remodela su estructura con cada ciclo reproductivo. Durante la preñez experimenta una alta tasa de proliferación, elongación y ramificación tubular y es en la lactancia cuando alcanza su máximo desarrollo. Prolactina (PRL) y progesterona (Pg) son los factores más importantes en la modulación de estos mecanismos. La angiogénesis es un proceso que implica desarrollo de microvasculatura y ocurre durante el desarrollo de un órgano lo cual es esencial para el aporte adecuado de nutrientes. En este trabajo se analizan las expresiones, a nivel proteico y de ARNm, de los receptores de PRL (PRL-R) y Pg (Pg-R) y del factor vascular de crecimiento endotelial (VEGF) en GM en reposo, preñez, lactancia e involución de hembras de *Lagostomus maximus*. Cada marcador estudiado evidencia un aumento significativo de su expresión en la preñez, alcanzando su máximo en la lactancia para luego disminuir con la involución de la GM (ANOVA, n=6, p<0.05). VEGF correlaciona más fuertemente con PRL-R tanto en la preñez ($IC_{VEGF-PRLR}$=0.95, p<0.05) como en la lactancia ($IC_{VEGF-PRLR}$= 0.97, p<0.05) y en estas etapas también se registran los mayores contenidos de PRL hipofisaria tanto a nivel proteico como de ARNm (n=5, p<0.05). Asimismo, el análisis de proliferación celular de la GM por inmunomarcación con anti-PCNA muestra una mayor densidad óptica durante estos mismos estadios. VEGF y Pg-R de GMs en involución ($IC_{PgR-VEGF}$=0.75, p>0.05) exhiben valores de expresión que se acercan a los valores de reposo y esto se encuentra acompañado por una disminución significativa de los niveles séricos de Pg (n=9, p<0.05). Teniendo en cuenta el rol de la PRL como principal efector de crecimiento y desarrollo mamario y analizando la correlacion de su perfil de expresión con el de VEGF, proponemos a esta hormona como candidata a la regulación positiva de este factor pro-angiogénico en GM de *L. maximus* durante la preñez y la lactancia. PIP0272 CONICET-Fundación Científica Felipe Fiorellino

542 (272) DIMORFISMO SEXUAL DE LOS METABOLISMOS GLUCÍDICO Y LIPÍDICO EN RATONES CON EXCESO CRÓNICO DE HCG ENDÓGENA

Agustina Marcial Lopez[1]; Ana Suarez Ortega[1]; Laura Daniela Ratner[1]; Guillermina Stevens[1]; María Marta Bonaventura[1]; Ana Alzamendi[2]; Eduardo Spinedi[3]; Andres Giovambattista[2]; Victoria Lux-Lantos[1]; Ricardo Saul Calandra[1]; Susana Beatriz Rulli[1]
IBYME-CONICET, Buenos Aires[1] IMBICE, La Plata[2] CENEXA, La Plata[3]

Estudios previos indican que la expresión crónica de la hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG) en ratones transgénicos portadores de las subunidades β (hCGβ+) o α/β de hCG (hCGαβ+) altera el fenotipo en ambos sexos. Las hembras hCGβ+ y hCGαβ+ son infértiles, presentan niveles circulantes elevados de prolactina, andrógenos y progesterona, y desarrollan tumores. Los machos hCGαβ+ son infértiles, con elevadas androgenemia y progesteronemia. El objetivo fue analizar los metabolismos glucídico y lipídico en ratones de tipo salvaje (WT), hCGβ+ y hCGαβ+ adultos (6 meses de edad) de ambos sexos. Evaluamos ingesta alimentaria, peso corporal y niveles séricos de hCG, triglicéridos, colesterol, insulina y leptina. Analizamos también la respuesta a glucosa e insulina y la histología tisular (páncreas e hígado). Los niveles séricos de hCG fueron 5 y 30 veces mayores en machos y en hembras hCGβ+, respectivamente; y 1000 veces superiores en hCGαβ+ de ambos sexos. Los machos WT, hCGβ+ y hCGαβ+ presentaron similar insulinemia, leptinemia, triglyceridemia y colesterolemia. Las curvas de tolerancia a glucosa e insulina resultaron alteradas en ambos grupos (p<0,05), sin cambios histológicos tisulares. Los machos hCGβ+ mostraron mayor ingesta de comida y peso corporal (p<0,01). Las hembras hCGβ+ y hCGαβ+ presentaron niveles elevados de insulina, leptina y triglicéridos, con obesidad, intolerancia a la glucosa e insulinorresistencia (p<0,05); la histología pancreática indicó infiltración lipídica y la hepática infiltraciones lipídica e inflamatoria. Estos resultados demuestran que hCG induce una respuesta metabólica (glucídica y lipídica) dimórfica, que resulta ser dependiente del sexo y de los niveles circulantes de hCG. Las alteraciones metabólicas serían más susceptibles en el fenotipo femenino, mientras que el masculino protegería, al menos en parte, el desarrollo de las mismas.

544 (433) TRATAMIENTO CON DIETILNITROSAMINA (DEN) PARA EL INICIO DE HEPATOCARCINOMA (HCC) EN MODELO DE DIABETES TIPO 1 EN RATONES

Ainelén Arboatti[1]; Lamberticci Flavia[1]; Frances Daniel E[1]; Pisani Gerardo B[2]; Monti Juan A[1]; Carrillo María Cristina[1]; Alvarez María De Lujan[1]; María Teresa Ronco[1]; Cristina Ester Carnovale[1]
Instituto de Fisiología Experimental-CONICET[1] Cátedra de Morfología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR.[2]

El estado diabético produce en el hígado modificaciones que aumentan la sensibilización del mismo a desarrollar HCC. Para analizar las posibles vías intracelulares implicadas en esta sensibilización, en una primera etapa nos propusimos desarrollar el modelo de HCC con una única dosis intraperitoneal (ip) del carcinógeno completo DEN. Ratones C57BL/6 fueron separados en: Control (C, vehículo), DBT (Estreptozotocina, 200mg/kg pc, ip), DBT tratados con insulina (I). (DBT+I), C+DEN (75mg/kg pc), DBT+DEN y DBT+I+DEN (n=4 c/u). La administración subcutánea de I mantuvo la glicemia en el rango 6-9 mM. A las 4 semanas de la inyección de DEN, se realizó la eutanasia de los ratones. En cortes de hígado se realizaron estudios histológicos y la cuantificación de hepatocitos en las distintas fases del ciclo celular (inmuhistoquímica PCNA). El tratamiento con I normalizó glicemia y niveles plasmáticos de fructosaminas en DBT y DBT+DEN. El grupo DBT+I+DEN mostró un aumento en: Relación Peso Hígado/ Peso Corporal (+40%*), hepatocitos en fase G1 (+433%*), hepatocitos en fase S (+164%*), hepatocitos en fase M (+900%*), índice de proliferación (IP, hepatocitos en fase G1, S, G2 y M,+323%*) (*p<0,05 vs C). Además, DBT+I+DEN mostró aumento en hepatocitos en fase S (+35%#) y en fase M (+82%#) (#p<0,05 vs DBT+I), no observándose modificaciones en IP (+18%). No se observaron grupos de hepatocitos basófilos

(hematoxilina-eosina) en ninguno de los grupos con DEN. Se evaluaron por Western blot marcadores de la progresión del ciclo celular: ciclina (Cyc) D1, E y G1. DBT+I+DEN mostró sólo un aumento en CycE (+179%#) que tiene máxima expresión en fase S. Estos resultados ponen en evidencia que la dosis de DEN utilizada induce una progresión en el ciclo celular hacia la fase M, pero no llega a aumentar el IP. Concluimos que la dosis de DEN utilizada no fue suficientemente efectiva para lograr una alteración en los hepatocitos que asegure el inicio del proceso de hepatocarcinogénesis.

545 (499) LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE UN BLOQUEANTE DEL RECEPTOR AT2 DE ANGIOTENSINA II REDUCE LA SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA IN VIVO

Iván Andrés Cervino; Valeria Burghi; Lucía Mazziotta; Marina Cecilia Muñoz; Fernando Pablo Dominici
IQUIFIB, Depto. de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

Se ha demostrado que niveles circulantes elevados de angiotensina II promueven insulinoresistencia y diabetes tipo 2 y que este efecto estaría mediado por la activación de los receptores AT1 (AT1R). Por el contrario, se conoce poco sobre el papel del receptor AT2 (AT2R) en la modulación de las acciones de la insulina. Recientemente se reportó que el AT2R mediaría efectos contrarios a los promovidos por el AT1R. Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este estudio se analizó la hipótesis de que el receptor AT2 es un modulador positivo de las acciones de la insulina. Para ello, se usaron ratones normales macho C57BL/6J a los que se les administró diariamente y durante 3 semanas 10 mg/kg de un antagonista del receptor AT2 (PD123319) por vía i.p. (n=8). Los animales controles recibieron solución salina (n=8). Al finalizar el tratamiento, se administró una dosis suprafisiológica de insulina vía vena cava (10 UI/kg) o solución salina para investigar la activación basal. Mediante la técnica de Western Blotting se observaron cambios significativos en mediadores de la vía de transducción de señal de la insulina en el hígado y tejido adiposo. El antagonismo crónico del receptor AT2 redujo significativamente la respuesta a la insulina en términos de la fosforilación del receptor de insulina en residuos de tirosina (n=4; $p<0,05$) así como en la fosforilación de los residuos necesarios para la activación total de la enzima Akt en ambos tejidos (n=4; $p<0,01$). Estas alteraciones fueron concomitantes con un aumento en la activación de la MAP quinasa p38 en condiciones basales (n=4; $p<0,05$). Se concluye que el antagonismo de los receptores AT2 *in vivo* atenúa la transducción de señal de insulina de manera tejido específica. Por ello el receptor AT2 se señala como un posible modulador positivo de la señalización de la insulina en ratones normales.

546 (528) EFECTO DEL HIPOTIROIDISMO SOBRE LA INMUNIDAD CELULAR T

Eduardo Valli[1];Alicia Juana Klecha[12]; Nicolás Gigena[3]; Diego Martinel[12]; María Laura Barreiro Arcos[1]; Helena A Sterle[1]; Jc Perazzo[2]; Claudia Pellizas[3]; Gabriel Rabinovich[4]; Graciela Alicia Cremaschi[12]
BIOMED[1] Fac. de Farmacia Y Bioquímica[2] CIBICI[3] IBYME[4]

Las hormonas tiroideas (HTs) afectan el metabolismo y la inmunidad. El objetivo aquí fue analizar la influencia del hipotiroidismo sobre la funcionalidad celular T. Para ello, se trataron ratones C57Bl/6J con propiltiouracilo (PTU, 0.5 ug/ml de agua de bebida/15 días) (grupo hipo-) o con placebo (grupo eutiroideo, eu-). Los niveles séricos de HTs se cuantificaron por RIA (eu- T3:70±2.5 ng/dl, T4:4.5±0.4 ug/dl, *vs* hipo- T3:57±3 ng/dl, T4:<2.0 ug/dl). La proliferación de las células T estimuladas con anticuerpos anti CD3+CD28+ fue menor en animales hipo-. Cortes de bazo hipotiroideos teñidos con hematoxilina-eosina mostraron desorganización focal con zonas atróficas. En tanto su tinción tricrómica mostró desorganización en ciertas zonas, folículos pequeños y atróficos, con reducción de la fibrogénesis. Además, la inducción de apoptosis en los bazos hipotiroideos fue evidenciada en inmunohistoquímica por un incremento en cantidad de células con marca tanto para caspasa 3 activa, como para tunel. Estos efectos fueron revertidos por tratamiento del hipotiroidismo con T3 (0.2 ug/g/6 días). Por otra parte, se evaluó por qPCR la expresión genómica del transportador de HT, MCT8 y de la deiodinasa 2 (DIO2), las que aumentan en el grupo hipo-, unas 50 y 35 veces respectivamente. Podemos sugerir que la disminución de la proliferación celular T, los hallazgos compatibles con apoptosis de células linfoides y la reducción de fibrogénesis observados en el hipotiroidismo experimental serían provocados por la reducción de los niveles de HTs y no se relacionarían con potenciales efectos tóxicos del PTU sobre las células inmunes, dado que tales efectos se revierten con reemplazo hormonal y las células hipotiroideas conservan la capacidad de responder fisiológicamente ante la carencia de HTs, elevando los niveles tanto de su transportador como de DIO2.

547 (593) TRES NUEVAS MUTACIONES EN EL GEN DICER1 EN PACIENTES CON TUMORES HEREDITARIOS PEDIÁTRICOS

Jesica A Galeano; Roxana Marino; Pablo Ramirez; Natalia Perez Garrido; Elisa Vaiani; Maríana Costanzo; Laura De La Rosa; Gabriela Obregón; Guillermo Chantada; Marco Aurelio Rivarola; Alicia Belgorosky
Hospital de Pediatría Juan P Garrahan SAMIC

Introducción: Mutaciones germinales en el gen DICER1 presentan riesgo aumentado de padecer ciertos tumores que incluyen Blastoma Pleuropulmonar, Nefroma Quístico, Bocio Multinodular, Tumor Neuroectodérmico Primitivo, Rabdomiosarcoma Embrionario Uterino, Tumor ovárico de células Sertoli-Leydig. DICER1 codifica para una proteína esencial en el procesamiento y maduración de los miRNAs. Mutaciones germinales en este gen causarian una alteración en el procesamiento de los miRNAs y desregulación de oncogenes target lo que llevaría a un riesgo aumentado de tumorigenesis En la mayoría de los tumores descriptos, existe una mutación en la línea germinal heterocigota y una segunda mutación somática en el alelo salvaje (segundo "hit"). Por lo tanto, una vez identificada la mutación germinal, es importante poder realizar el análisis molecular en muestra de tejido tumoral para hacer el diagnóstico. Objetivos: Determinación de mutaciones germinales en el gen *DICER1* en 3 pacientes con tumores hereditarios pediátricos del espectro *DICER1*. Métodos: Amplificación de los exones codificantes y regiones intrónicas flanqueantes mediante PCR y secuenciación automática. Casos clínicos: P1 niña con tumor ovárico de células de Leydig-Sertoli bilateral diagnosticada a a la edad de 5 años; P2, niña con tumor ovárico de células de Leydig-Sertoli y bocio multinodular con un primer diagnóstico a los 12 años; y P3, varón con nefroma quístico diagnosticado a los 2 años. Resultados: Detectamos 3 mutaciones heterocigotas no descriptas previamente en los pacientes estudiados: p.Trp1098* en P1, p.Phe3515fs*1 en P2 y p.Asp244Glyfs*27 en P3. Dichas mutaciones predicen la aparición de una proteína truncada a la cual le faltan los dominios RNAsa IIIa, RNAsa IIIb y los sitios de unión a metales, esenciales para la actividad enzimática. Conclusiones: En este estudio reportamos 3 nuevas mutaciones en el gen DICER1. El estudio molecular del gen *DICER1* permite identificar a las familias de alto riesgo, realizar un diagnóstico temprano y ofrecer asesoramiento genético con respecto al riesgo de recurrencia familiar.

548 (611) EL HIPOTIROIDISMO INDUCE INVOLUCIÓN PREMATURA DE LA GLÁNDULA MAMaría AUMENTANDO LA EXPRESIÓN DE CASPASAS Y PARP AL FINAL DE LA LACTANCIA

Fiorella Campo Verde Arbocco; Corina Veronica Sasso; Ruben Walter Caron; María Belen Hapon; Graciela Alma Jahn
IMBECU

En trabajos previos hemos demostrado que el hipotiroidismo (HipoT) tiene un efecto deletéreo en la lactancia alterando las vías de señalización que participan en la diferenciación maMaría, generando estasis de leche e induciendo reestructuración del tejido mamario al final de la lactancia. Se ha demostrado que en

la involución maMaría, las células epiteliales sufren apoptosis por Anoikis. Este mecanismo de muerte celular es mediado por lisosomas e involucra la activación de la vía de las Caspasas y la expresión de bax. Previamente demostramos que el HipoT genera involución prematura del tejido mamario y altera la expresión de proteínas estructurales en el día 21 de lactancia (L21). El objetivo de este trabajo fue analizar si la involución inducida por el HipoT involucra a las Caspasas y la muerte celular por Anoikis. Se determinó la expresión de Caspasa-8/3, PARP y BAX mediante inmunohistoQuímica y análisis histológico. Se usaron ratas Wistar hembras tratadas con 0,1 g/l PTU (hipoT) en el agua de bebida (n=3). En L21 se obtuvieron las glándulas maMarías inguinales. Se fijaron en formol y se hicieron cortes de 5 micras. El grupo HipoT mostro desestructuración del tejido mamario junto con un aumento en la expresión de las Caspasas-8/3 y PARP ($p< 0.05$). Si bien la expresión de Bax no se alteró por el hipoT, el análisis de la histoaquitectura reveló mayor abundancia de tejido adiposo, menos alveolos totales y menos alvoelos activos ($p< 0.05$). Al mismo tiempo en el grupo HipoT encontramos abundantes alveolos colapsados y con células en claro proceso de Anoikis. Considerando que el hipoT genera estasis de leche, estos resultados nos permiten pensar que la tensión celular causada por la falta de vaciamiento alveolar desencadenaría en forma prematura la muerte celular por Anoikis claramente visible en las glándulas HipoT. Al mismo tiempo, el aumento en la expresión de las Caspasas facilitaría el proceso apoptotico promoviendo la involución maMaría acelerada.

549 (629) VALIDACIÓN DEL USO DE CÁPSULAS DE SILASTIC PARA LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE ESTRADIOL Y PROGESTERONA EN RATAS ADULTAS

Florencia Merino[1]; Nadia Bourguignon[2]; Mercedes Imsen[1]; Camila Racana Narvaez[1]; Victoria Lux-Lantos[2]; Adriana Seilicovich[1]; Sandra Zárate[1]
INBIOMED[1] IBYME[2]

La ovariectomía seguida de Reemplazo Hormonal (RH) es un modelo ampliamente usado para determinar los efectos individuales del estradiol (E2) y la progesterona (P4) en diversos procesos. Sin embargo, no existe consenso sobre el método de administración ni las dosis más adecuadas para mantener niveles hormonales estables dentro del rango fisiológico en tratamientos crónicos. Nuestro objetivo fue validar un modelo de RH con cápsulas de silastic conteniendo E2, P4 o E2+P4 por 6 semanas y comparar los niveles de E2 obtenidos por RIA versus un kit comercial de ELISA. Ratas hembras adultas fueron ovariectomizadas e implantadas s.c. con cápsulas de silastic vacías (OVX) o conteniendo 1mg E2 (OVX-E2), 50mg P4 (OVX-P4) o ambas (OVX-E2+P4) y luego de 2, 4 o 6 semanas determinamos las concentraciones plasmáticas de dichas hormonas por RIA. Los niveles de E2 se encontraron dentro del rango fisiológico en OVX-E2 y OVX-E2+P4 y los de P4 en OVX-P4 y OVX-E2+P4. El peso uterino confirmó la eficacia de la RH ($p<0.01$).

	2 semanas	4 semanas	6 semanas
OVX	13.7±2.0	11.7±0.0	s/datos
OVX-E2	49.3±2.3	29.0±0.0	40.8±3.7
OVX-P4	7.2±1.3	16.3±4.6	s/datos
OVX-E2+P4	78.9±39.6	61.2±0.6	47.7±24.7
P4 (ng/ml)			
OVX	4.8±2.0	1.8±0.9	1.7±0.7
OVX-E2	15.0±4.1	12.7±2.2	12.0±2.2
OVX-P4	21.5±12.0	20.2±2.3	34.6±27.3
OVX-E2+P4	17.8±1.8	21.4±5.8	15.5±5.4
Peso uterino/peso			
OVX	0.7±0.1	0.4±0.1	0.7±0.2
OVX-E2	2.1±0.1*	1.5±0.2*	2.0±0.2*
OVX-P4	0.6±0.1	0.5±0.1	0.6±0.1
OVX-E2+P4	1.9±0.1*	1.6±0.1*	2.1±0.2*

Los niveles de E2 en el ciclo estral obtenidos por RIA fueron superiores a los obtenidos por ELISA pero dentro de niveles fisiológicos (Proestro:99.5±19.6 vs 50.8±17.0, Estro:58.6±15.4 vs 9.9±7.3, Diestro:45.5±16.8 vs 6.8±1.2 ng/ml;$p<0.05$). Nuestros resultados validan el uso de cápsulas de silastic conteniendo 1mg de E2 y 50mg de P4 para la administración crónica de estos esteroides al mantener su liberación sostenida dentro del rango fisiológico por varias semanas. No encontramos beneficios adicionales en el uso del kit comercial de ELISA para E2 frente al RIA.

550 (657) LA DEHIDROTESTOSTERONA (DHT) ESTIMULA LA SECRECIÓN DE PROGESTERONA Y ALDOSTERONA Y DISMINUYE LA PRODUCCIÓN DE CORTISOL EN CÉLULAS ADRENOCORTICALES HUMANAS

María Cecilia Alonso Burgos; Mercedes Maceiras; Nora Saraco; Paula Aliberti; Marco A. Rivarola; Alicia Belgorosky; María Sonia Baquedano
Htal. de Pediatria Garrahan

La 17-Hidroxiprogesterona (17OHP) puede convertirse a DHT por la vía alternativa o "backdoor pathway" sin los intermediarios DHEA, androstenediona (A) y testosterona (T). Estudios recientes muestran que esta vía es responsable de la síntesis de DHT en estados patológicos donde se acumula 17OHP adrenal. Sin embargo, se desconoce su rol en la fisiología de la corteza adrenal humana. Resultados previos del laboratorio muestran que la corteza adrenal humana posnatal expresaría las enzimas para completar todas las reacciones de la vía alternativa, así como el receptor de andrógenos (AR), sin un claro patrón de expresión zonal. El objetivo fue evaluar el rol de DHT en la esteroidogénesis adrenal. La incubación con DHT (18hs), disminuyó la producción de cortisol y estimuló la secreción de progesterona (P) y aldosterona en condiciones basales (-1.3, +1.8 y +4 veces, respectivamente) y en presencia de 8-bromo-AMPc (-1.6, +2,2 y +2 veces, respectivamente) en células adrenocorticales humanas NCI-H295R de manera dosis-dependiente a partir de concentraciones $\geq$ 100nM ($p<0.05$), y este efecto no fue bloqueado por hidroxiflutamida, antagonista de AR. DHT no afectó la expresión de ARNm de CYP17A1 medida por RT-PCR en tiempo real. En estudios en función del tiempo, el aumento en la secreción de P se observó a partir de los 5 min, con un aumento significativo luego de 30 min de tratamiento con DHT ($p<0.05$). Ensayos funcionales con y sin de DHT en células COS-7 transfectadas con el plásmido de CYP17 y utilizando P como sustrato mostraron que la actividad 17α-hidroxilasa se inhibió un 50% ±6, $p<0.05$. La androsterona (metabolito backdoor) estimuló la secreción de P ($p<0.05$), mientras que no se hubo cambios significativos con T, DHEA y A (metabolitos vía clásica). Se podría postular a la DHT producida localmente como un regulador parácrino/autócrino de la esteroidogénesis, regulando la secreción de cortisol y aldosterona por inhibición post-transcripcional de la actividad de CYP17.

551 (659) ROL DE WNT3A Y β-CATENINA EN PROLACTINOMAS EXPERIMENTALES Y HUMANOS

Gianina Demarchi[1]; Fiorella Spinelli[1]; Daiana Vitale[1]; Laura Alaniz[1]; Silvia Berner[2]; Carolina Cristina[1]
CENTRO DE INVESTIGACIONES BÁSICAS Y APLICADAS CIBA CITNOBA CONICET-UNNOBA[1] Servicio de Neurocirugía, Clínica Santa Isabel[2]

La vía de señalización Wnt promueve la autorrenovación y diferenciación celular. En la vía canónica los ligandos Wnt estabilizan a β-Catenina permitiendo su translocación al núcleo y la transcripción de genes diana. La desregulación de la vía y la localización nuclear de β-Catenina se asocian con la carcinogénesis. Se ha reportado la alteración de Wnt3a en algunos tipos de cáncer pero su papel en los tumores de hipófisis aún no ha sido estudiado. Estudios previos del laboratorio en modelos de prolactinomas murinos generados con Estradiol (E2) mostraron una relocalización de β-CATENINA desde la membrana hacia el núcleo y variaciones en la expresión de distintos componentes sugiriendo la activación de la vía Wnt en el modelo. Con tales antecedentes, en el presente trabajo nos propusimos estudiar el efecto del ligando Wnt3a en la activación de la vía y en el comportamiento de la línea de los lactotropos tumorales MMQ derivados de un prolactinoma de rata producido con E2. Adicionalmente determinamos la expresión de β-CATENINA en

prolactinomas de nuestra cohorte de adenomas hipofisarios humanos Por qRT-PCR determinamos un aumento del ARNm de componentes de la vía canónica Wnt tales como β-*Catenina (N=3, p<0,05;)* y el gen diana *Ciclina D1 (N=3, NS) luego de* 2hs de tratamiento con 0,25 y 1 ng/ml de Wnt3a. Asimismo el ligando modificó los niveles de expresión del ARNm de *Prolactina* en los lactotropos y de manera interesante aumentó los niveles del factor angiogénico *Vegf.* Mediante Western Blot determinamos que Wnt3a incrementó los niveles de β-CATENINA (p=0,085, N=2) y CICLINA D1. Entre las muestras de adenomas hipofisarios humanos detectamos por IHQ expresión de β-CATENINA con distintos niveles de localización en citoplasma, membrana y núcleo sugiriendo la activación de la vía Wnt en los prolactinomas. Concluimos que la vía canónica Wnt a través de Wnt3a y β-Catenina participaría en la tumorogénesis de los adenomas hipofisarios secretores de prolactina

552 (554) GENES CITOPROTECTORES Y SU RELACION CON LA DEFICIENCIA DE ANDRÓGENOS

Veronica Biaggio[12]; Silvana Piguillem[2]; María Veronica Perez Chaca[2]; María Eugenia Ciminari[2]; Silvina Monica Alvarez[12]; Susana Ruth Valdez[3]; Nidia Noemi Gómez[12]
IMIBIO-SL[1] Laboratorio de Anatomía y Fisiología- Universidad Nacional de San Luis[2] IMBECU[3]

Los andrógenos juegan un importante rol fisiológico en la función pulmonar. Sumado a ello, se sabe que hay un incremento de enfermedades pulmonares en hombres adultos mayores. Por otro lado, la expresión de las proteínas de shock calórico (Hsp) pueden ser utilizada como un biomarcador sensible cuando las células son sometidas a condiciones de estrés. Ratas macho de la cepa Wistar (200 ± 20 g) fueron separadas en tres lotes: controles (Co), castradas (Ca), y un grupo de ratas castradas a las que se les administró Testosterona durante los últimos cinco días previos al sacrificio (Ca+T). Se obtuvo tejido pulmonar a los 30 y 90 días de tratamiento y se analizaron los cortes histológicos de pulmón en ambos tiempos, además de determinar niveles de andrógenos y TBARS. Se realizó inmunohistoquímica de Hsp27 y Hsp70i. Los niveles de andrógenos fueron significativamente menores en el grupo Ca (p<0,0001), con respecto al grupo Co y en el grupo Ca+T los valores tienden a alcanzar los valores de los Co, estando los niveles de TBARS incrementados en los Ca, al comparar con los respectivos controles. Hsp27 disminuye en Ca a los 30 días (p<0,001), mientras que a los 90 días aumenta en Ca (p<0,05). Ca+T sólo aumenta significativamente a los 90 días (p<0,01). Hsp 70i aumenta significativamente en Ca a los 30 días (p<0,001) mientras que disminuye en Ca+T (p<0,01). A los 90 días aumenta en Ca (p<0,05) y en Ca+T (p<0,01). A partir de la información analizada podemos sugerir que la actividad citoprotectora está disminuida en forma marcada a los 30 días de castración, pero no ocurre lo mismo a los 90 días. Estos resultados sugieren que la deficiencia de andrógenos induce estrés en el pulmón, con aumento de los niveles de TBARS en una situación de deficiencia androgénica, sincrónicamente con cambios en la expresión de marcadores de citoprotección. Esta situación es muy marcada en la primera etapa de la deficiencia, haciéndose menos evidente a medida que aumenta el tiempo de castración.

CARDIOVASCULAR 4

553 (85) COMPARACIÓN DE ISQUEMIA NO SIMULADA POR CESE DE FLUJO CON LA ISQUEMIA SIMULADA EN CORAZONES PERFUNDIDOS DE RATÓN

Nehuén Salas[1]; Ariel Escobar[2]; Yuriana Aguilar[2]; Alicia Mattiazzi[1]; Carlos Valverde[1]
Centro de Investigaciones Cardiovasculares, UNLP/CCT La Plata CONICET[1] School of Engineering, UC Merced, Merced, Tx, EE.UU.[2]

Introducción: El corazón sometido a una isquemia sufre una disfunción en el manejo del calcio (Ca^{2+}) intracelular y en la función contráctil, que se recupera parcialmente durante la reperfusión del mismo. La magnitud de estas alteraciones se agrava en función del tiempo de duración de la isquemia. Para el estudio de esta patología se utilizan diferentes preparados, siendo el más común la retroperfusión aórtica (tipo Langendorff) del corazón aislado sometido a isquemia global o regional por cese de flujo. Algunos estudios requieren la utilización de cardiomiocitos aislados, los cuales por sus características son sometidos a una isquemia simulada químicamente. Objetivos: Comparar la función mecánica, el Ca^{2+} citosólico y la fosforilación de proteínas clave en el manejo del Ca^{2+} citosólico durante la isquemia global no simulada y la simulada químicamente. Materiales y métodos: Para el estudio se utilizaron ratones macho de la cepa Balb/c de 2 meses de edad. Luego de anestesiarlos con ketamina/diazepam (100 y 5 mg/Kg respectivamente) i.p., se practicó una toracotomía para extraer el corazón. El mismo se montó en un equipo de perfusión tipo Langendorff a flujo y temperatura constantes. Para evaluar la actividad mecánica (presión desarrollada por el ventrículo izquierdo, PDVI, y presión de fin de diástole, PFDVI) se colocó un globito de látex en el ventrículo izquierdo, conectado a un transductor de presión con registro por computadora. Para evaluar el Ca^{2+} citosólico en corazones intactos, los mismos se cargaron con el indicador fluorescente sensible a Ca^{2+} y se midió la fluorescencia por microscopía de campo local pulsado. Luego de un periodo de estabilización, los corazones se sometieron a dos técnicas de isquemia (15 minutos) y reperfusión (3 minutos) (I/R), una por cese global de flujo (INS), y otra por isquemia simulada (IS) (pH 6,2, ausencia de glucosa, y reemplazo del O_2 por N_2). Para el estudio de fosforilación de proteínas, se congelaron corazones rápidamente en N_2 líquido a diferentes tiempos durante el protocolo de I/R (preisquemia, isquemia, y reperfusión). Resultados: Durante la estabilización (preisquemia, PI) no hubo diferencias significativas en la actividad mecánica de ambos grupos de corazones. Durante la isquemia se observó una disminución en la PDVI en ambos protocolos (INS e IS), siendo menos pronunciada en la IS. Durante la reperfusión los corazones con IS presentan una mayor recuperación contráctil que los INS (48,5±6,2 vs 11,9±6,6%, respectivamente, P< 0,05). La contractura isquémica al final de la isquemia en los corazones IS fue menor que en los INS (29,0±5,5 vs. 56,6±3,1%, respectivamente, P<0,05), manteniéndose esta diferencia durante la reperfusión. Adicionalmente se observó en la isquemia, una disminución en la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} que acompañó lo observado en la PDVI. La fosforilación del residuo Thr^{17} de fosfolamban (proteína reguladora de la SERCA2a) por activación de la quinasa CaMKII (evidencia indirecta de aumento del Ca^{2+} intracelular) a los 3 minutos de reperfusión fue mayor en la INS respecto a la IS (812±46 vs 155±26%, respectivamente, P<0,05). No se observaron cambios en la fosforilación (mediada por la quinasa PKA) del residuo Ser^{16} de PLN. Discusión y/o conclusiones: La isquemia simulada produce una alteración por isquemia y reperfusión más leve que la isquemia no simulada. Estos resultados indican que al utilizar estos protocolos de I/R simulada se deben tener en cuenta las diferencias mecánicas y bioquímicas que presentan.

554 (211) EL ROL DE LA MITOCONDRIA Y METABOLISMO ENERGÉTICO EN DISTINTOS GRADOS DE ENDOTOXEMIA

Tamara Vico; Virginia Vanasco; Pablo Evelson; Silvia Alvarez
IBIMOL

La endotoxemia se asocia con disfunción mitocondrial y estrés oxidativo. Procesos endotoxémicos leves se vinculan a desórdenes cardiometabólicos y envejecimiento, mientras que procesos endotoxémicos moderados a graves se vinculan a síndromes inflamatorios sistémicos como sepsis. El objetivo de este trabajo fue analizar la función mitocondrial en un modelo de endotoxemia leve, moderada y grave. Para ello se trataron ratas hembra Sprague-Dawley de 45 ± 5 días de edad, con las siguientes dosis ip de LPS: 0; 0,5; 2; 4 y 8 mg/kg. A las 6 hs se sacrificaron los animales y se extrajo el corazón. Se utilizó el ventrículo izquierdo y se determinó el consumo de O_2 en cortes de tejido y mitocondrias aisladas, junto con la actividad de los complejos

mitocondriales. El consumo de O_2 en estado 3 (sustrato: malato-glutamato) mostró una relación inversa al aumentar el grado de endotoxemia (control: 153 ± 4; 0,5 mg/kg: 162 ± 8 y 8 mg/kg: 143 ± 5 ng-at O/min.mg proteína; p<0,05), mientras que la actividad de los complejos I (control: 484 ± 22 nmol/min.mg proteina) y IV (control: 28,2 ± 1.6 min^{-1}/mg proteina), si bien mostraron una tendencia a disminuir con la severidad del cuadro endotoxémico, las diferencias no fueron significativas. Los resultados muestran que la severidad del síndrome endotoxémico podría estar asociada a distintos grados de disfunción mitocondrial, destacando la importancia del status bioenergético celular.

555 (213) EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE LA FOSFODIESTERASA-5A (FDE5A) EN EL MIOCARDIO HIPERTRÓFICO DE RATAS SHR

Daiana Sabrina Escudero; Romina Gisel Díaz; María Soledad Brea; Enrique Leo Portiansky; Néstor Gustavo Pérez
Centro de Investigaciones Cardiovasculares

En un trabajo previo demostramos que el aumento de actividad de PKG por inhibición de FDE5A con sildenafil (SIL) inhibe al intercambiador Na^+/H^+ miocárdico (NHE1). Dado que la hiperactividad del NHE1 está vinculada al desarrollo de hipertrofia cardíaca, el objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos de SIL en el miocardio hipertrófico de ratas SHR. Inicialmente se evaluó la capacidad inhibitoria de SIL (1µM) sobre el NHE1 en cardiomiocitos aislados de SHR dado que no existían datos previos. Se midió eflujo de H^+ (J_{H+}) a un pH_i común de ~6.8 durante la recuperación del pH_i post-acidosis (pulso de amonio) en ausencia de bicarbonato, donde el único mecanismo activo de regulación del pH_i es el NHE1. SIL disminuyó significativamente el J_{H+}: (en mmol/L/min) 12.93±3.80, n=5 vs. 2.09±0.87, n=4 (p<0.05), confirmando su efecto inhibitorio sobre el NHE1. Seguidamente tratamos ratas SHR de 8 meses de edad crónicamente (3 meses) con SIL (100mg/Kg/día, n=4) y las comparamos con sus respectivos controles no tratados (n=6). El tratamiento disminuyó el cociente peso ventricular izquierdo/peso corporal (índice de hipertrofia) de 3.2±0.1e^{-3} mg/g (SHR control) a 2.7±0.1e^{-3} mg/g (SHR+SIL). En concordancia, cortes histológicos de ventrículo izquierdo mostraron una menor área de sección transversal de los cardiomiocitos en las ratas tratadas (688±39 vs. 496±23 μm^2, p<0.05). Además, se observó una disminución significativa de la fibrosis miocárdica evaluada mediante porcentaje total de colágeno intersticial (7.01±0.018 vs. 1.36±0.003%, p<0.05), lo cual tuvo su correlato en una menor rigidez de la pared evaluada mediante la comparación de curvas longitud-tensión en músculos papilares aislados (p<0.05, ANOVA de 2 vías). Los resultados muestran que la inhibición aguda de FDE5A por SIL inhibe la actividad del NHE1 en ratas SHR, sugiriendo que dicho efecto sería responsable de la mitigación de la hipertrofia cardíaca y la menor rigidez de los corazones tratados crónicamente con SIL.

556 (246) UNA MUTACIÓN QUE PREVIENE LA FOSFORILACIÓN POR PKA EN EL RECEPTOR DE RIANODINA CARDIACO (RYR2) INCREMENTA EL POTENCIAL ARRITMOGÉNICO DE LOS RYR2 QUE PRESENTAN UNA MUTACIÓN CANÓNICA PARA CPVT

Julieta Palomeque[1]; Jonathan J Hernandez[2]; Francisco J Alvarado[2]; David J Bradley[3]; Roberto Ramos Mondragon[2]; Xi Chen[2]; Hctor H Valdivia[2]
Universidad Nacional de La Plata[1] University of Michigan-Center for Arrhythmia Research[2] University of Michigan-Pediatric Cardiology[3]

Es confuso el efecto de la fosforilación por PKA sobre el fenotipo disfuncional de receptores de rianodina cardiacos (RyR2) mutantes en la Taquicardia Ventricular Polimórfica Catecolaminérgica (CPVT). Para develarlo estudiamos una familia de miembros heterocigotos para 1) una mutación canónica CPVT (Y4721C), 2) una mutación insensible a PKA (R2027H), o 3) ambas. Examinamos la historia clínica familiar. Y4721C y R2027H fueron generados por mutagénesis específica. Ratones knock-in RyR2-S2030A, RyR2-R4496C o combinados fueron estudiados a nivel electrocardiográfico y celular. Se realizaron ensayos de unión de [^{3}H]rianodina y Western Blots (WB). El padre acarrea Y4721C, tuvo un síncope por esfuerzo de adolescente, comenzó con fibrilación auricular (FA) a los 40 años y presenta miocardiopatía dilatada. La madre, asintomática, porta R2027H. Dos de los hijos con ambas mutaciones tienen un fenotipo severo, con recurrentes resucitaciones. Las generaciones subsecuentes, asintomáticas, tienen las mutaciones aisladas. Los WB mostraron fosforilación por PKA del WT y del Y4721C, pero no del R2027H. La activación dependiente de Ca^{2+} de R2027H y WT fueron similares (EC50=618±144 y 728±56nM) y menor en Y4721C (434±56nM); sin embargo, la co-expresión de ambas mutaciones produjo un desplazamiento mayor en la curva de afinidad por Ca^{2+} (250±25nM, p<0.05, n=6). El electrocardiograma intracardiaco mostró una mayor incidencia de FA en los ratones con ambas mutaciones que en el resto. Las liberaciones de Ca^{2+} espontáneas de los miocitos fueron (Hz) para los WT: 0.04±0.02; los R4496C: 0.04±0.02; los S2030A: 0.15±0.06; y para los R4496C-S2030A: 0.31±0.03 (p<0.001, n=12-23 células por grupo). La expresión de subunidades de RyR2 insensibles a PKA en el marco de una mutación CPVT ligeramente arritmogénica (Y4721C), aumenta la sensibilidad al Ca^{2+} e incrementa dramáticamente la severidad de la enfermedad. La fosforilación por PKA pareciera ser benéfica, para prevenir la arritmogénesis en CPVT.

557 (314) CITOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS, APOPTOSIS Y TGF-ß1 EN UN MODELO DE PROGRAMACION FETAL DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR INDUCIDA POR UNA DEFICIENCIA MODERADA DE ZINC DURANTE EL DESARROLLO Y EL CRECIMIENTO

Lorena Vanesa Juriol[1]; Marina Dasso[2]; Melisa Saravia[2]; María Natalia Gobetto[1]; Leandro Guttlein[4]; Jorge Toblli[3]; Rosana Elesgaray[1]; Cristina Arranz[1]; Analia Lorena Tomat[1]
Fac.de Farmacia y Bioquímica. Univ. de Buenos Aires. Iquimefa[1] Fac. de Farmacia y Bioquímica. Univ. de Buenos Aires[2] Htal. Alemán[3] Instituto Leloir[4]

La deficiencia moderada de zinc durante la vida fetal y postnatal es un modelo de programación de hipertensión arterial y enfermedad cardiaca en ratas macho, caracterizado por menor crecimiento, peso y contractilidad del ventrículo izquierdo (VI). Evaluar citoquinas pro-inflamatorias, apoptosis y factor de crecimiento transformante beta1 (TGF-β1) en VI de ratas adultas de ambos sexos expuestas a una deficiencia moderada de zinc durante la preñez y el desarrollo como posibles mecanismos involucrados en las alteraciones cardiacas observadas previamente. Ratas Wistar fueron expuestas, desde la preñez hasta el destete, a una dieta control (C, 30 ppm) o deficiente en zinc (B, 8 ppm). Luego del destete, las crías macho (m) y hembra (h) C continuaron con dieta C (CCm y CCh) y las crías B m y h continuaron con dieta B o C durante 60 días (BBm, BBh, BCm y BCh). A los 81 días de vida, se evaluó en VI: expresión proteica de TGF-β1 (TGF-β1/β-actina;western blot), número células apoptóticas (NNA/área;TUNEL) y citoquinas pro-inflamatorias: interleuquina-6 y factor de necrosis tumoral-alfa (IL-6,TNF-α;% tinción positiva/área;IHQ). BBm y h presentan un aumento en NNA/área (CCm:5±1; BBm:43±9*;BCm:4±1;CCh:5±1;BBh:20±2†&;BCh:6±1) y de IL-6 (CCm:1,8±0,3;BBm:21±2*;BCm:2,8±0,8;CCh:1,7±0,4;BBh:21±2†;BCh:2,5±0,7) y TNF-α (CCm:1,4±0,4;BBm:20±2*;BCm:1,7±0,3;CCh:1,4±0,3;BBh:21±2†;BCh:1,6±0,4) vs CC. Siendo mayor el NNA/área en BBm vs BBh. Respecto a TGF-β1, BBm y h presentan menor expresión proteica vs CCm y h (CCm:1±0,1;BBm:0,2±0,1*;BCm:0,8±0,1;CCh:1±0,2;BBh:0,5±0,1†; BCh:0,7±0,3).*p<0,05 vs CCm;†p<0,05 vs CCh;&p<0,05 vs BBm. La deficiencia de zinc pre y postnatal determina alteraciones inflamatorias, apoptóticas y del TGF-β1. Estas contribuirían al menor crecimiento, ausencia de remodelado hipertrofico y las alteraciones funcionales observadas en m. Sin embargo, en h, no serían suficientes para desencadenar alteraciones funcionales, observándose una menor susceptibilidad y/o protección.

559 (400) REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL MEDIA- DA POR EL PÉPTIDO NATRIURÉTICO TIPO C: PARTICIPACIÓN DE FACTORES VASOACTIVOS

Carolina C Caniffi[1]; Susana Novella[2]; Carlos Hermenegildo Caudevilla[2]; Cristina Arranz[1]
Fac. Farmacia y Bioquímica, IQUIMEFA, CONICET-UBA[1]
Fac. de Medicina, Universidad de Valencia[2]

La producción y liberación de factores vasoactivos en células endoteliales (CE) contribuye a mantener una adecuada función e integridad de la pared vascular. Objetivo: evaluar el efecto del péptido natriurético tipo C (CNP) sobre la producción de óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI_2) y tromboxano A_2 (TXA_2) en CE. Materiales y métodos: se utilizaron CE de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) incubadas (24 hs) con CNP (0,1µM), $cANP_{(4-23)}$ (agonista selectivo del receptor natriurético tipo C (NPR-C), 0,01 µM), y/o L-NAME (inhibidor no selectivo de la NO sintasa (NOS), 0,1 mM). Se determinó (% respecto al control): producción de NO (sonda fluorescente DAF-FM 4-amino diacetato) y de prostanoides PGI_2 y TXA_2 (EIA). Se cuantificó (Western blot, UA): NOS endotelial (eNOS/actina), su fosforilación (eNOS-P/eNOS), ciclooxigenasas-1 y -2, y PGI2 sintasa (densidad/actina). Los resultados se expresan como media±ESM, n=6/grupo. Análisis: ANOVA un factor, post-test Bonferroni. Resultados:(*p<0,01 vs CNP).

	CNP	$cANP_{(4-23)}$	CNP+L-NAME
NO	168±17	170±13	99±7*
PGI_2	190±37	91±13*	166±27
TXA_2	94±10	78±19	82±19

El CNP aumentó la producción de NO respecto al control (p<0,01) y dicho aumento fue similar al observado con el agonista de NPR-C. Ambos péptidos aumentaron la fosforilación y el contenido total de eNOS con respecto al control (p<0,01). La producción de PGI_2 aumentó sólo en presencia de CNP, mientras que el TXA_2 no presentó diferencias con los tratamientos. Además, no se observaron diferencias en el contenido proteico de las enzimas responsables de la síntesis de prostanoides ante los distintos tratamientos frente al control. Conclusión: El CNP estimula positivamente mecanismos involucrados en la regulación de la homeostasis del sistema vascular. El aumento en la producción de NO y de PGI_2 podría favorecer el mantenimiento de una adecuada función endotelial.

560 (543) NITROSILACIÓN DE ACUAPORINA-1 CARDIACA EN RESPUESTA AL ESTRÉS OSMÓTICO DURANTE LA ETAPA DE CRECIMIENTO

Vanina A Netti[12]; Agustina Iovane[2]; Elsa Zotta[3]; Andrea Fellet[2]; Ana María Balaszczuk[2]
Laboratorio de Biomembranas, IFIBIO-HOUSSAY, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires[1] Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. IQUIMEFA-CONICET[2] Laboratorio de Fisiopatogenia, Facultad de Medicina, UBA[3]

La acuaporina-1 (AQP1) se expresa en el corazón y transportaría óxido nítrico (NO), un regulador de la función cardiaca. El objetivo de este trabajo fue estudiar los cambios en AQP1 y el sistema del NO en respuesta al estrés osmótico inducido por la restricción de agua durante el crecimiento. Ratas macho Sprague-Dawley de 25 y 50 días (n=10) fueron divididas en: R: restricción de agua 3 días; C: agua ad libitum 3 días. Se determinaron: actividad de NO sintasa (NOS), niveles proteicos, localización y nitrosilación de AQP1 y los efectos del dador de NO nitroprusiato de sodio (SNP) sobre la permeabilidad osmótica al agua de vesículas de membrana de corazón. La restricción de agua indujo un estado de deshidratación en ambos grupos etarios. AQP1 se localizó en el endocardio y endotelio del corazón de animales controles de ambas edades. La hipovolemia no alteró la localización o abundancia de AQP1 en animales del grupo R25, pero en el grupo R50, AQP1 se localizó en la membrana de los cardiomiocitos y sus niveles proteicos se incrementaron. La actividad de NOS y la nitrosilación de AQP1 aumentaron en R25, sin haber diferencias entre animales C y R de 50 días. Por otra parte, las membranas cardiacas aisladas que expresan AQP1 presentaron un coeficiente de permeabilidad osmótica compatible con la presencia de acuaporinas funcionales (Pf: 326±17 µm/s, n=6) y el pretratamiento con SNP disminuyó la permeabilidad al agua (Pf: 102±4 µm/s, n=5). Concluimos que los cambios en AQP1 y el sistema del NO cardiaco frente al estrés osmótico dependen de la edad estudiada. El aumento de la actividad de NOS en el grupo de 25 días podría inducir la nitrosilación de AQP1, descendiendo la permeabilidad osmótica al agua de las membranas e impactado negativamente en el balance de agua cardiaco. En el grupo de 50 días, los cambios en la abundancia y localización de AQP1 podrían contribuir al mantenimiento de la homeostasis hídrica cardiaca durante la hipovolemia.

561 (562) ALTAS DOSIS DE LA PROTEÍNA HIGH MOBILITY GROUP BOX-1 (HMGB1) INDUCEN LA EXPRESIÓN DE VEGF Y ANGIOGÉNESIS EN OVEJAS CON INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO

Carlos Sebastián Giménez; Paola Locatelli; Anna Hnatiuk; Rodrigo Ramírez; María Del Rosario Bauzá; Elin Gennero; Alberto Crottogini; Luis Cuniberti; Fernanda Daniela Olea
Universidad Favaloro

La cardiopatía isquémica sigue siendo la causa de morbimortalidad más frecuente a nivel mundial y local. Su complicación más grave, el infarto agudo de miocardio (IAM), y su consecuencia, la insuficiencia cardíaca, son responsables del 31% de las muertes en Argentina. La inducción a la angio-arteriogénesis y a la miocardiogénesis aparecen como alternativas promisorias. Se ha demostrado que la administración de la proteína pro-inflamatoria HMGB1 en ratones con infarto agudo de miocardio (IAM) induce angiogénesis por sobreexpresión de VEGF y miocardiogénesis por proliferación de células madre cardíacas c-kit+ y su diferenciación a cardiomiocitos, mejorando la función ventricular. Se desconoce el efecto de HMGB1 en mamíferos grandes, lo cual dificulta que los resultados observados en ratones puedan ser extrapolados al hombre. Tampoco se sabe si el efecto de HMGB1 es dosis-dependiente. Nuestro objetivo, entonces, fue evaluar los efectos de dos dosis diferentes de HMGB1 en ovejas con IAM para una eventual traslación a la clínica. Para ello, se operaron 21 ovejas a las cuales se les inyectó a las 4 hs del IAM dosis altas (10 mg, n=7), y dosis bajas (1 mg, n=7) de HMGB1 o placebo (PBS, n=7) en el peri-IAM. A los 7 días los animales fueron sacrificados y se tomaron muestras de miocardio para cuantificar VEGF (RT-qPCR) y para cuantificar capilares (inmunohistoquímica anti-lectina). La densidad capilar fue mayor que en placebo (1,71±0,19 cap/mm^2) en el grupo con altas dosis (2,88 ±0,5 cap/mm^2, p<0.05) pero no con bajas dosis (2.35 ±0.39 cap/mm^2, p=NS vs. placebo, X±DS, ANOVA-Bonferroni). Igualmente, la expresión del gen de VEGF fue 3,8± 2,9 veces mayor que en placebo en el grupo con alta dosis (p<0.01) y 2,2±1,8 veces mayor con bajas dosis (p=NS). Conclusión: dosis altas (pero no bajas) de HMGB1 inducen sobreexpresión de VEGF y angiogénesis en un mamífero grande con IAM.

562 (584) PARTICIPACIÓN DE LA QUINASA DEPENDIENTE DE CALCIO Y CALMODULINA (CAMKII) EN EL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO INDUCIDO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN DEL MIOCARDIO

Maríano Nahuel Di Carlo; Romina V Becerra; Juan I Maríangelo; Margarita A Salas; Cecilia Mundiña-Weilenmann; María M Said; Leticia Vittone
Centro de Investigaciones Cardiovasculares CCT CONICET La Plata UNLP

Restablecer el flujo sanguíneo luego de una obstrucción coronaria, si bien es esencial para prevenir el daño miocárdico, da lugar a efectos adversos como disfunción contráctil, arritmias y muerte celular (injuria por isquemia y reperfusión, I/R). Durante la I/R aumentan las especies reactivas del oxígeno y se altera la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, condiciones que pueden afectar la función de plegamiento de las proteínas por parte del retículo endoplasmático (RE) dando lugar al llamado estrés del RE. Ambas situaciones también activan a la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} y calmodulina tipo II (CaMKII). En respuesta al estrés del RE se sintetizan proteínas con el fin de revertirlo y normalizar la fun-

ción celular: GRP78 asociada a la supervivencia celular y CHOP promotora de muerte celular. Objetivo: identificar la presencia de estrés del RE a través de la expresión de estas proteínas y relacionarlo con la activación de CaMKII. Corazones aislados y perfundidos de rata, se sometieron a 45 min de isquemia global seguida de 15min de reperfusión, en presencia y ausencia del inhibidor de CaMKII: KN-93. Controles: corazones sin isquemia (Ctrl). Se evaluó la activación de CaMKII por su autofosforilación y la expresión de GRP78 por inmunodetección y el nivel relativo de ARNm de GRP78, CHOP y GAPDH (normalizador). A los 15min de reperfusión se detectó un aumento en la actividad de CaMKII. Al mismo tiempo se encontró un incremento en la expresión de GRP78 respecto a los valores controles, que disminuyó significativamente por el tratamiento con KN-93 (I/R: 131,4±6,5% vs I/RKN 96,8±8,2% n=5-10). El nivel de ARNm de GRP78 y CHOP aumentó en la I/R: Ctrl 0,48±0,07 UA vs I/R: 0,93±0,19 UA para GRP78 y Ctrl 0,35±0,04 UA vs I/R: 0,66±0,06 UA para CHOP. Los resultados muestran la presencia de estrés del RE durante la I/R y sugieren la participación de CaMKII en la producción del mismo. Disminuir el estrés del RE podría ser un blanco terapéutico en la cardiopatía isquémica.

563 (591) INTERACCIONES DE WNT Y EL RECEPTOR TIPO 1DE ANGIOTENSINA 2 EN EL ENVEJECIMIENTO CARDÍACO

Julia M Gallino Fernandez; Florencia Amanda Marchese; Eduardo A. Garcia Gras
CESyMA,ECyT, Universidad Nacional de San Martín

Las señales de wnt controlan la diferenciación de varios tipos celulares así como la homeostasis del tejido adulto. Asimismo varios estudios proponen un rol para esta señal en el proceso de envejecimiento. Pruebas experimentales y clínicas muestran claramente que la inhibición crónica del receptor tipo 1 de angiotensina 2 (A2T1R) previene varios efectos negativos asociados al envejecimiento cardiaco (fibrosis, arritmias, falla cardiaca, etc). Considerando la existencia de varios cruces intracelulares de las vías de transducción de las señales de wnt y A2T1R postulamos que al menos algunos de los efectos observados en la inhibición de la vía de A2T1R podrían estar mediados por cambios en las señales de wnt. Para evaluar esta hipótesis analizamos la evolución de los componentes de la señal de wnt en el tiempo en ratones machos BALB/C de 2, 6, 12 y 15 meses sin tratar y tratados con 0,3 mg/ratón/día de losartán a partir de los 2 meses. A las edades indicadas se analizó la expresión cardiaca de los genes de interés mediante PCR en tiempo real. La expresión de la mayoría de los componentes de las señales de wnt disminuye entre los 2 y los 15 meses de edad. Sin embargo algunos tienen un pico de expresión a los 6 meses y otros no cambian. Cabe destacar que existen al menos 3 vías de señalización de wnt que pueden ser alternativamente activadas según la identidad y concentración de los componentes. El tratamiento crónico con losartán retrasó la disminución de la expresión de los genes cuya expresión decae en el tiempo (ej FZD1, FZD7), o un aumento de la expresión de los que no varían (ej: LRP5, LRP6). Finalmente en otros casos no hubo respuesta al losartán (ej: FZD4, FZD5). En conclusión se observa una relación entre el tratamiento con losartán y el mantenimiento de una alta expresión tanto de los receptores como co-receptores de la vía de señalización de wnt. Estudios futuros podrán dilucidar si este patrón se observa también para targets río abajo de la vía.

564 (626) ROL DEL DÉFICIT DE GALECTINA-3 SOBRE EL REMODELAMIENTO VENTRICULAR EN UN MODELO CRÓNICO DE INFARTO DE MIOCARDIO EN RATONES

Nadia Laura Martinez Naya; Pablo Cassaglia; María E. Aruanno; Isaac L. Morgunovsky Michell; Veronica Volberg; Celina Morales; German E. Gonzalez; Ricardo J. Gelpi
Instituto de Fisiopatología Cardiovascular (INFICA), Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Previamente mostramos que el déficit de Galectina 3 (Gal3) aumenta el tamaño de infarto (IM) y produce un efecto desfavorable sobre el remodelamiento ventricular (RV) a los 7 días postIM. El objetivo del presente trabajo fue evaluar si el déficit de Gal3 modifica la evolución crónica del RV postIM en ratones. Métodos: Ratones C57 y Gal3 KO con ligadura permanente de la arteria coronaria o sham fueron divididos en 4 grupos: 1) C57 Sham; 2) Gal3 KO Sham; 3) C57+IM y 4) Gal3 KO+IM. A las 4 semanas post-cirugía se realizó ecocardiografía y se cuantificó el tamaño de IM (TIM, tricrómico de Masson), el espesor de cicatriz y la fibrosis en la cicatriz. Resultados:(Media ± ESM)

	C57 Sham(3)	Gal3 KO Sham(3)	C57 IM(6)	Gal3 KO IM(4)
TIM(%)	--	--	31±4	34±4
FE(%)	59±3	66±8	40±4*	36±4#
DDVI(mm)	4±0,1	4±0,2	5±0,1	6±0,3#
DSVI(mm)	3±0,1	3±0,4	4±0,3	5±0,3#
Fibrosis cicatriz(%)	--	--	85±1	74±3†
Espesor Septum(µm)	--	--	91±6	61±3†

FE: fracción de eyección; DSVI y DDVI: diámetro sistólico y diastólico del VI respectivamente; *p< 0,05 C57 Sham vs C57IM; #p< 0,05 Gal3KO Sham vs Gal3KO IM; † p< 0,05 C57 IM vs Gal3KO IM Conclusión: El déficit de Gal3 incrementó la dilatación ventricular y redujo el colágeno en la cicatriz a las 4 semanas. Aquí, no observamos la diferencia en la función ventricular (FV) entre C57 IM y Gal3 KO IM que previamente reportamos a los 7 días postIM. Esto sugiere que la atenuación del proceso reparativo producido por la falta de Gal3 desde el inicio del IM mantuvo deprimida la FV.

565 (277) LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO SON LAS RESPONSABLES DEL FENÓMENO DE LA ESCALERA NEGATIVA EN LA RATA

María Sofía Espejo; E. Alejandro Aiello; Verónica C. De Giusti
Centro de Investigaciones Cardiovasculares Dr. Horacio E. Cingolani

La relación entre frecuencia de estimulación y fuerza (RE-F) es un importante mecanismo de regulación de la contractilidad cardíaca. Una RE-F positiva se refiere a que un aumento en la frecuencia de estimulación induce un aumento de la fuerza de contracción; mientras que en una RE-F negativa la fuerza de contracción disminuye. Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son las mediadoras intracelulares del efecto inotrópico positivo inducido por Angiotensina II, Endotelina y Aldosterona. La formación de ROS durante la RE-F no ha sido investigada en su totalidad. El objetivo del presente trabajo es investigar la RE-F en ratas y la participación de los ROS en dicho fenómeno. Se aislaron miocitos ventriculares de ratas Wistar, que fueron expuestos a frecuencias de estimulación de 0.5, 1, 2 y 3 Hz en un medio HCO_3^-/CO_2 5%, y se evaluó la contractilidad. Los datos se expresan como el porcentaje de aumento con respecto a 0.5 Hz en 1, 2 y 3 Hz, respectivamente. * p<0.05 vs HCO_3^-. En HCO_3^- la RE-F fue negativa (1Hz 0.63±3.34, n=11; 2Hz 6.55±4.46, n=10; 3Hz -5.77±5.11, n=10), mientras que en presencia de Cariporide 10µM la escalera fue positiva (1Hz 10.79±1.17*, n=15; 2Hz 28.33±4.88*, n=13; 3Hz 30.91±6.54*, n=9). Dado que el Cariporide es un inhibidor del intercambiador sodio/hidrógeno (NHE-1), pero también fue demostrado que previene la salida de ROS mitocondriales, quisimos evaluar si su efecto sobre la RE-F era debido a la inhibición de la actividad del NHE-1 o secundario a la prevención del aumento citosólico de ROS. Pre-incubamos a los miocitos con MPG 2 mM (secuestrador de ROS) o con Apocinina 300 µM (inhibidor de la NADPH oxidasa), y en ambas situaciones encontramos que se revertía la escalera negativa (MPG: 1Hz 10.29±3.23, n=4; 2Hz 22.02±6.52, n=4; 3Hz 31.66±8.86*, n=3; Apo: 1Hz 7.99±0.88, n=6; 2Hz 21.86±3.31, n=6; 3Hz 12.75±5.30, n=5). Concluimos que el aumento en la frecuencia de estimulación genera un incremento de ROS, generando un efecto negativo en la respuesta contráctil.

566 (664) ESTUDIO DEL TRÁFICO DEL RECEPTOR MAS A NIVEL NEURONAL Y SU RELACIÓN CON 3LA PATOGÉNESIS DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Flavia Micaela Cerniello; Mariela Gironacci
IQUIFIB

El sistema renina angiotensina (SRA) consiste en dos ejes contrabalanceados: uno presor constituido por el eje Enzima Convertidora de Angiotensina 1/ Angiotensina II/ Receptor AT1 y un eje depresor constituido por Enzima Convertidora de Angiotensina 2/ Angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)/ Receptor Mas (RMas). En la hipertensión arterial existe un desbalance entre ambos brazos. Hipotetizamos que el tráfico del RMas está alterado en la hipertensión arterial a nivel central, y ello contribuiría al desbalance entre los dos brazos del SRA en la hipertensión. Nuestro objetivo es investigar el tráfico del RMas a nivel neuronal en la hipertensión arterial. Para ello trabajamos con cultivos primarios de neuronas de tallo cerebral de ratas Wistar-Kyoto (WKY) y espontáneamente hipertensas (SHR). Evaluamos el contenido del RMas por Western-Blot (WB), la afinidad de unión del RMas por su ligando y el contenido intraneuronal endógeno de Ang-(1-7) por radioinmunoensayo (RIA) y observamos: mayor expresión del RMas en neuronas de SHR con respecto a WKY pero menor afinidad de unión por su ligando y menores niveles endógenos de Ang-(1-7). Evaluamos luego colocalización con marcadores de tráfico en neuronas previamente estimuladas con Ang-(1-7) 1µM durante 15 y 30min. El RMas colocalizó con arrestina, EEA1, marcador de endosomas temprano, y Rab11, marcador de vesículas de reciclado lento a la membrana, mientras que no se observó colocalización con el marcador de lisosomas. Sorprendentemente, el estímulo indujo un aumento en el contenido del RMas en el núcleo de las neuronas de SHR, determinado por colocalización del RMas con una sonda marcadora de núcleo, no así en las de WKY. Esto último estuvo de acuerdo con los resultados obtenidos por WB del RMas y por RIA de Ang-(1-7) en fracciones nucleares de neuronas estimuladas 30min con Ang-(1-7). Nuestros resultados demuestran que el RMas es endocitado a endosomas tempranos y luego reciclado a la membrana plasmática. Una fracción del RMas es direccionado al núcleo en las neuronas de SHR, lo cual demuestra que el RMas es regulado diferencialmente en la hipertensión arterial.

97 (55) LA INHIBICIÓN DE LA ISOFORMA 1 DEL CO-TRANSPORTE NA+/CO3H- ELECTROGÉNICO (NBCE1) EN LA RE- PERFUSIÓN DISMINUYE EL TAMAÑO DEL INFARTO Y ME- JORA EL ESTADO MITOCONDRIAL

Alejandro Ciocci Pardo; Luisa F González Arbeláez; Ernesto A Aiello; Susana M Mosca
Centro de Investigaciones Cardiovasculares CCT-CONICET

En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio demostramos que la inhibición del NBCe1 es una maniobra cardioprotectora. Con el objeto de examinar la participación de la mitocondria en esta intervención y las vías involucradas realizamos experimentos en corazones aislados de rata perfundidos por la técnica de Langendorff. Después de 20 minutos de estabilización, los corazones fueron asignados a los siguientes grupos experimentales: 1) Control (C): 110 min de perfusión; 2) Control isquémico: 30 min de isquemia global (interrupción total del flujo coronario) y 60 min de reperfusión; 2) AL3: un anticuerpo contra el dominio extracelular 3 del NBCe1 fue administrado durante los 10 min iniciales de la reperfusión. El tamaño del infarto (TI) fue medido por medio de la tinción con sales de tetrazolio. La presión desarrollada (PDVI) y la presión diastólica final (PDFVI) del ventrículo izquierdo fueron utilizadas para evaluar la función sistólica y diastólica, respectivamente. El estado mitocondrial fue determinado midiendo la respuesta al Ca^{2+} del poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria (a través de la dispersión de la luz, DL), la capacidad de retención de Ca^{2+} (CRC, por el método de Calcium Green) y el potencial de membrana ($\Delta\Psi m$, por medio de la rodamina) en mitocondrias aisladas de los distintos grupos experimentales También se midió la expresión de las formas fosforiladas de p38MAPK, ERK½, Akt y PKCe. AL3 disminuyó el TI (11 ± 2% vs 31 ± 2%) y mejoró la recuperación postisquémica de la función miocárdica (PDVI: 65 ± 3% vs 18 ± 5%.; PDFVI: 22 ± 3 vs 52 ± 7 mmHg al final de la reperfusión). El agregado de 200 µM de Ca^{2+} produjo una DL de 1.43 ± 0.10 u.a. en el grupo C, disminuyó a 0.27 ± 0.08 u.a. en CI y se recuperó hasta 1.27 ± 0.14 u.a. en el tratado con AL3. La CRC fue de 473 ± 9 en el grupo C, disminuyó en el grupo CI (5 ± 1) y se recuperó con AL3 llegando al valor de 466 ± 47 nmol/mg proteína. En CI se observó una despolarización que fue prevenida por el tratamiento con AL3 (-148 ± 4.mV vs -95 ± 6 mV, siendo de -145 ± 9.mV en el grupo C. La expresión de todas las quinasas mencionadas disminuyó en el grupo CI (entre 30 y 40%) y aumentó en el grupo tratado alcanzando valores mayores al 100%. Estos datos muestran que el bloqueo del dominio extracelular 3 del NBCe1 atenúa la muerte celular y mejora la función miocárdica postisquémica. Estas acciones beneficiosas van acompañadas de mejora del estado mitocondrial a través de vías que involucran a las quinasas p38MAPK, ERK½, Akt y PKCe.

NEUROCIENCIAS 6

567 (180) CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO DE LESIÓN DE RETINA DE ZEBRAFISH ADULTO POR INYECCIÓN INTRAOCULAR DE COCL2

Matías Pedro Medrano; M Paula Faillace
IFIBIO Houssay

A diferencia de los mamíferos, los peces teleósteos regeneran su retina luego de un daño. Para lesionar la retina y estudiar la proliferación y diferenciación celular en la regeneración, se utiliza al zebrafish y la inyección intraocular de toxinas, daños mecánicos o lumínicos. En el *zebrafish*, la inyección intravítrea de ouabaína provoca distintos grados de lesión o se utilizan daños lumínicos extremos para dañar selectivamente los fotorreceptores. En murinos, se observó que una inyección intravítrea de Cloruro de Cobalto ($CoCl_2$) puede provocar serios daños que, en concentraciones adecuadas, induce hipoxia química afectando principalmente a los fotorreceptores. Se evaluó la capacidad del $CoCl_2$ para inducir muerte selectiva de fotorreceptores en el *zebrafish* adulto y caracterizar el proceso de regeneración inducido por este método y compararlo con otras lesiones. Se realizó una inyección única intravítrea de $CoCl_2$ a distintas concentraciones y se analizó la morfología retiniana. Se cuantificó la proliferación celular a 2, 4 y 10 días post lesión (dpi), mediante una única inyección de BrdU. Se analizó la expresión del marcador glial GFAP y se midió por qPCR la expresión de genes marcadores de activación mitótica de progenitores retinianos (*lin28*, *ascl1a y pax6).* La inyección de 10mM de $CoCl_2$ eliminó la capa nuclear externa sin afectar mayormente a las otras capas retinianas e indujo una alta proliferación celular. Se describió un pico proliferativo alrededor de los 4 dpi. La expresión de GFAP fue inducida por el daño y se observó co-localización con glia de Müller BrdU+. La expresión de genes marcadores de proliferación aumentó significativamente. Una inyección única de 10mM de $CoCl_2$ genera una lesión reproducible que daña a la capa nuclear externa, haciendo de esta lesión una herramienta útil para el estudio del proceso de regeneración en *zebrafish* y como modelo de enfermedades neurodegenerativas en las que se dañan priMaríamente los fotorreceptores.

568 (446) EFECTO PROTECTOR DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EN LA INDUCCIÓN DE SENESCENCIA PREMATURA EN CÉLULAS DE EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA

Pablo Sebastián Tate; Mariela C. Marazita; Melisa D. Marquioni Ramella; Angela M. Suburo
Universidad Austral

La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es una enfermedad crónica progresiva de la retina que lleva a la pérdida irreversible de la visión. Se postula que la senescencia celular

prematura del epitelio pigmentario de la retina (EPR) podría jugar un papel principal en la etiología de la AMD. Altos niveles de estrés oxidativo son característicos de la enfermedad. El daño oxidativo es un inductor conocido de senescencia celular. Objetivos: Estudiar el efecto de compuestos polifenólicos, presentes en la dieta, en la respuesta senescente promovida por daño oxidativo en células de epitelio pigmentario de la retina ARPE - 19. Hipótesis: Los compuestos polifenólicos disminuyen los efectos del daño oxidativo inducido por H_2O_2, disminuyendo la activación del mecanismo de senescencia prematura. Metodología: Células ARPE-19 fueron tratadas con ácido caféico (12,5µg/ml) o ácido clorogénico (100 µM) durante 2 horas y luego expuestas a daño H_2O_2 (150 µM) por 90 minutos. Finalizado el daño, las células fueron incubadas por 24 horas en medio fresco con el agregado de los compuestos polifenólicos. Este protocolo fue repetido por 3 días. Se evaluó la inducción de senescencia mediante la detección de la actividad de β-galactosidasa (β-gal +) por tinción con el sustrato X-Gal. Se evaluó la expresión de otros dos marcadores característicos de senescencia, p21 y p16, por Western blot Resultados: El tratamiento con ambos compuestos, ácido clorogénico y caféico, redujo significativamente (entre un 16 y 29% respectivamente, $p < 0,05$) el número de células β-gal + en respuesta al daño daño por H_2O_2. Resultados similares se observaron en la expresión de p21 y p16. Conclusiones: Tanto el ácido caféico como el ácido clorogénico protegen contra el daño oxidativo en células ARPE-19, disminuyendo la inducción del fenotipo senescente. Estos tratamientos podrían tener implicancias en el control de la degeneración tisular característica de la DMAE.

569 (455) RETINOPATIA DIABETICA: CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO MODELO ANIMAL MURINO

María Constanza Paz[1]; Paula Virginia Subirada[1]; Magalí Evelin Ridano[1]; Claudia Castro[2]; María Cecilia Sánchez[1]
CIBICI-Dpto. Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC[1] CIBICI-Dpto. Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC[2]

La diabetes tipo 2, que constituye un síndrome metabólico (SM), desencadena a nivel retinal complicaciones microvasculares conocidas como retinopatía diabética (RD). Varios modelos animales de RD han sido estudiados pero ninguno ha podido reproducir en su totalidad esta patología. En este trabajo se propone caracterizar un modelo murino de RD que conjugue las alteraciones del SM y reproduzca las etapas observadas en humanos. Para ello se utilizaron ratones C57BL/6 (WT) y deficientes en Apolipoproteína E (ApoE-KO) alimentados con dieta normal (DN) o con dieta rica en fructosa (DF) (10%) suministrada en el agua de bebida a partir de los 2 meses (M). A los 8 M de edad se analizaron en sangre niveles de glucosa y lípidos y se realizaron estudios funcionales retinales (ERG). Sobre las retinas extraídas se realizaron análisis histoquímicos y de inmunofluorescencia (IF). Al tiempo evaluado tanto los ratones WT DF como los ApoE-KO DN y DF presentaron hiperglucemia y dislipemia, alteraciones significativas en la onda b del ERG y POs disminuidos en los ratones WT DF y ausentes en los ApoE-KO DN y DF, siendo revertidos bajo tratamiento con pioglitazona (20 mg/kg). El estudio histoquímico (flatmount) mostró una disminución en la densidad vascular en los ApoE-KO DN y DF y en el número de cél. musculares lisas (α-SMA) tanto en los ApoE-KO como en los WT DF. Al evaluar muerte celular, se observaron células TUNEL-positivas a nivel de la capa de CG en los WT DF, incrementando en los ApoE-KO DN y DF. Por IF se observó expresión de GFAP en astrocitos de WT DN, mientras que los WT DF mostraron además expresión en células de Müller activadas, siendo incrementada en los ApoE-KO DN y DF. Los resultados indican que al tiempo evaluado tanto ratones WT DF como ambos grupos ApoE-KO presentaron alteraciones compatibles con RD. Posteriores estudios permitirán caracterizar los mecanismos involucrados en el desarrollo de esta afección ocular en estos modelos animales.

571 (513) LA EXPOSICIÓN A AMBIENTE ENRIQUECIDO PREVIENE EL DAÑO ISQUÉMICO RETINIANO

María Florencia Gonzalez Fleitas; Hernan Hugo Dieguez; Damián Dorfman; María Inés Keller Sarmiento; Ruth E. Rosenstein
CEFYBO

La isquemia retiniana es un componente central de diversas enfermedades visuales que son causas prevalentes de ceguera irreversible. Al presente, no existen recursos eficaces para la prevención y terapéutica del daño isquémico retiniano. En trabajos previos, demostramos que la exposición a ambiente enriquecido (AE) *a posteriori* de un evento isquémico retiniano agudo, provee protección funcional e histológica respecto al daño observado en animales albergados en ambiente estándar (AS). El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la exposición a AE en forma previa al daño isquémico retiniano. Para ello, ratas *Wistar* macho adultas fueron albergadas en AS o AE durante 3 semanas previas a la isquemia. El AE consistió en jaulas grandes conteniendo 6 animales/jaula, ruedas y objetos de diferentes formas, texturas y colores que se reposicionaron 1 vez/día y se sustituyeron completamente 1 vez/semana. El AS consistió en jaulas estándar de laboratorio que albergaron 2 animales/jaula. Luego de una isquemia retiniana unilateral (inducida por aumento de la presión intraocular a 120 mmHg durante 40 min), ambos grupos de animales se albergaron en AS. A las 3 semanas post-isquemia,se analizó la función (por electrorretinografía, ERG) y la histología retinianas (análisis morfométricoy número de células ganglionares retinianas (CGRs) por inmunomarcación para Brn3a). En animales albergados en AS, la isquemia indujo una caída significativa en la amplitud de las ondas a y b del ERG ($P<0,05$), una disminución significativa en el espesor total de la retina ($P<0,01$) y en el número de CGRs ($P<0,05$), respecto a retinas no isquémicas. La exposición a AE previno significativamente la disminución en la amplitud de las ondas a y b del ERG ($P<0,01$), en el espesor total de la retina ($P<0,01$) y en el número de CGRs ($P<0,05$) inducidas por isquemia. Estos resultados sugieren que la exposición previa a AE podría disminuir la vulnerabilidad de la retina al daño isquémico.

572 (519) LAS METALOPROTEINASAS SON ESENCIALES PARA LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS GLIALES DE MÜLLER INDUCIDA POR ESFINGOSINA-1- FOSFATO

María Victoria Simon[12]; Facundo H. Prado Spalm[12]; Marcela Vera[123]; Nora P. Rotstein[123]
INIBIBB[1] Univ. Nac. del Sur[2] CONICET[3]

Las células gliales de Müller (CGM) son el principal tipo glial en la retina. Distintos daños a la retina inducen su activación, originando la "gliosis" reactiva, cuya proliferación y migración anormales son claves en el desarrollo de las enfermedades proliferativas de la retina. Poco se sabe sobre los mecanismos que regulan estos procesos. Recientemente determinamos que la esfingosina-1- fosfato (S1P), un esfingolípido bioactivo, promueve la migración de las CGM. Investigamos ahora las vías de señalización activadas por la S1P y si las metaloproteinasas, enzimas involucradas en la migración celular, median la migración glial inducida por S1P.Cultivos puros de CGM de retina de rata se sometieron al ensayo de cicatriz y luego se suplementaron o no con W146 (10 µM) o BML-241 (10 µM), antagonistas de los receptores de membrana para S1P (S1PR) 1 y 3, respectivamente; LY294002 (50 µM), U0126 (10 µM) y SB203580 (1 µM), inhibidores de las vías de la PI3K, ERK/ MAPK y p38 MAPK, respectivamente; o TIMP-1 (300 ng/ml), pan inhibidor de las metaloproteinasas. Se incubaron después con S1P 5 µM, analizando la migración glial luego de 17 hs. Los cultivos suplementados con S1P mostraron una marcada migración de las CGM. El agregado de BML-241 disminuyó marcadamente la migración glial, tanto en cultivos controles como tratados con S1P, mientras que el W146 no afectó dicha migración. La pre-incubación con LY294002 o U0126 redujo en más de 60% la migración glial inducida por S1P, mientras que la disminución con SB203580 no fue significativa. El pretratamiento con TIMP-1 prácticamente bloqueó la migración de las CGM, inducida con S1P, reduciéndola a la observada en los controles. Nuestros resultados indican que la S1P activa al S1PR3

y las vías de señalización PI3K y ERK/MAPK para estimular la migración glial. También sugieren que las metaloproteinasas son esenciales en este proceso y que la S1P regularía su activación o su expresión para promover la migración glial.

573 (539) ROL DE LOS RECEPTORES X RETINOIDEOS EN LA SUPERVIVENCIA DE LAS CÉLULAS DEL EPITELIO PIGMENTADO DE LA RETINA

Victoria B Ayala-Peña[1]; María F Pilotti[2]; Olga L German[1]
INIBIBB[1] Univ. Nac. del Sur[2]

La degeneración de la mácula relacionada a la edad (AMD) es una de las principales causas que llevan a la ceguera en la población adulta y actualmente no posee cura ni tratamiento efectivo. En la AMD la degeneración por apoptosis de las células del epitelio pigmentado de la retina (EPR) resulta en la desaparición progresiva e irreversible de las neuronas fotorreceptoras con la consecuente pérdida gradual de la visión, donde el estrés oxidativo juega un papel importante. En las células del EPR se ha demostrado que los receptores X retinoideos (RXR) intervienen en la maduración de las mismas y en el ciclo visual de los retinoideos y se sabe que la activación de los RXR protege a las neuronas fotorreceptoras de la muerte por apoptosis inducida por distintos tipos de estrés oxidativo. Dado que para cumplir su función estos receptores se homo- o hetero-dimerizan, en este trabajo utilizamos diversos agonistas con diferentes afinidades por los RXR homo o heterodimerizados con otros receptores nucleares, y un antagonista de los mismos. Evaluamos la incumbencia de los RXR en la prevención de la muerte por apoptosis ante un daño oxidativo con H_2O_2 en las células D-407 (línea celular de epitelio pigmentado humano). Se estudió la supervivencia celular mediante el ensayo de MTT, fragmentación y pignosis nuclear y la expresión de caspasa-3 clivada mediante citoquímica, y la presencia de la escalera nuclear. El tratamiento con los agonistas de los homodimeros (RXR-RXR) y heterodimeros (RXR-PPAR) previnieron la muerte por apoptosis ante el daño oxidativo y el antagonista logró neutralizar esa protección. Sin embargo, un agonista de los RXR-RAR no previno la muerte en ninguna de las dosis ensayadas. Estos resultados sugieren que tanto los RXR homodimerizados como heterodimerizados con los PPAR participarían activamente en la protección del daño oxidativo en las células D-407.

574 (624) NANOMEDICINA: IDENTIFICACION DE BLANCOS TERAPÉUTICOS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

María Eugenia Navas Guimaraes[12]; María Beatriz Bistué Millón[12]; Eduardo Fernández-Megía[3]; Michael Wempe[4]; Claudio Cuello[5]; Martin Alejandro Bruno[125]
Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Ciencias Médica, Universidad Católica de Cuyo[1] CONICET[2] Departamento de Química Orgánica (CIQUS), Universidad de Santiago de Compostela, España.[3] Department of Pharmaceutical Sciences, University of Colorado, Denver, Co, USA.[4] Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montreal, Canadá.[5]

El inicio y la progresión de la Enfermedad de Alzheimer (EA) están relacionados con procesos neuroinflamatorios, de estrés oxidativo y asociados con el metabolismo del colesterol, los cuales se modulan a través de receptores X del hígado (LXRs) presentes en el cerebro. Específicamente, la activación de los LXRs cerebrales inducen un aumento en la expresión de la lipoproteína ApoE, la cual facilita la degradación proteolítica de la proteína beta amiloide (Aß) presente en el cerebro de pacientes con dicha patología. Agonistas de LXRs disminuyen el procesamiento amiloidogénico de la proteína precursora amiloide (APP), reduciendo los niveles cerebrales de Aβ, revirtiendo déficit de la memoria contextual en modelos transgénicos de EA. El presente proyecto está dirigido a evaluar los efectos cerebrales; en un ratón transgénico de AD, de la administración de un agonista de LXRs (llamado DMHCA) en forma diaria durante 28 días. Debido a que el mismo (por su carácter hidrofóbico), tiene limitada llegada al cerebro, se utilizaron nanocarriers (dendrimeros transportadores) los cuales son administrados vía intranasal donde su farmacocinética y biodistribución en zonas críticas afectadas por la patología amiloide son mayores respecto a la vías de administración sistémica. Con ésta alternativa terapéutica se observó una disminución en la acumulación cortical de Aß, aumentando los niveles de ABCA1 (intermediario post activación de LXRs) y ApoE, disminuyendo marcadores de neuroinflamación y estrés oxidativo tales como COX-2, Interleuquina 1-beta, iNOS, mejorando significativamente aspectos patológicos crónicos característicos de la enfermedad.

575 (638) EFECTO MODULADOR DE LAS PURINAS ENDÓGENAS SOBRE LA SECRECIÓN EVOCADA DE ACETILCOLINA

Javier Alberto González Sanabria; Maximiliano Hurtado Paso; Julieta Cavallucci; Adriana Losavio
Laboratorio de Neurofisiología - Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari - IDIM-CONICET

Anteriormente demostramos que, en sinapsis neuromuscular de mamífero, el ATP/ADP y su metabolito adenosina modulan la liberación de ACh al activar receptores (R) presinápticos inhibitorios $P2Y_{12\text{-}13}$ y A_1, respectivamente. Asimismo, hallamos que en terminales nerviosas despolarizadas por alto K^+, los antagonistas de dichos R aumentan la secreción asincrónica de ACh. Nuestro objetivo fue analizar el efecto de las purinas endógenas en preparaciones frénico-diafragma de ratones CF1 cuando las terminales nerviosas son despolarizadas por estimulación del nervio frénico. Estudiamos el efecto de antagonistas selectivos de los $RP2Y_{12\text{-}13}$ (2 µM AR-C69931MX) y RA_1 (0.1 µM DPCPX) sobre la amplitud de los potenciales de placa (EPPs) cuando el nervio es estimulado a 0.5, 5 ó 50 Hz (tren ó *bursts*). Se sabe que, dependiendo del patrón de estimulación, se produce fatiga de la neurotransmisión (la amplitud de los EPPs decrece un 25-75% durante los primeros 10 estímulos). Encontramos que AR-C69931MX y DPCPX no modificaron la amplitud de los primeros EPPs en ninguna de las frecuencias estudiadas. A 50 Hz (tren 750 pulsos ó 5 *bursts* de 150 pulsos) los antagonistas disminuyeron la depresión de la amplitud de los EPPs (últimos 20 EPPs/1º EPP, tren: control 15.5±1.0%, AR-C69931MX 29.9±4.2%, $p<0.05$, n:6; control 8.4±0.7%, DPCPX 10.1±0.9%, $p<0.05$, n:4; promedio 5 bursts: control 26.1±1.1%, AR-C69931MX 37.4±2.3%, $p<0.05$, n:5; control 17.5±1.2%, DPCPX 21.1±1.3%, $p<0.05$, n:3). No hubo diferencias significativas a 0.5 y 5 Hz. Los resultados demuestran que en terminales nerviosas estimuladas a 50 Hz (tren o *bursts*), las purinas generadas endógenamente inducen inhibición de la secreción de ACh al activar $RP2Y_{12\text{-}13}$ y RA_1, ya que la incubación con AR-C69931MX o DPCPX redujo el decremento de la amplitud de los EPPs. Este dato podría ser de utilidad para aquellas enfermedades neuromusculares (Miastenia Grave, etc) donde el factor de seguridad de la transmisión neuromuscular está comprometido.

576 (658) EFECTO DE STX2 Y LPS EN LAS ALTERACIONES NEUROLÓGICAS DEL TÁLAMO CAUSADO POR LA ENCEFALOPATÍA ASOCIADA AL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO EN UN MODELO MURINO

David Arenas - Mosquera[12]; Alipio Pinto[12]; Clara Berdasco[12]; Patricia A. Geoghegan[3]; Adriana Cangelosi[3]; Gabriela Brener[2]; Jorge Goldstein[12]
IFIBIO HOUSSAY[1] Lab. de Neurofisiopatología, Depto. de Fisiología, Fac. de Medicina, Universidad de Buenos Aires[2] Centro Nacional de Control de Calidad de Biológicos – ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" C.A.B.A.[3]

El síndrome urémico hemolítico es producido por la *Escherichia coli enterohemorrágica* que secreta los neurotóxicos Toxina Shiga (Stx) y lipopolisacárido (LPS). Con el objetivo de determinar la alteración de la unidad neurovascular de los núcleos ventral anterior y lateral del tálamo por estas toxinas, se utilizaron ratones machos Swiss-NIH (n=4 por tratamiento) y se les inoculó Stx2 (1ng/animal) y/o LPS (800 ng/animal) o vehículo (sc. fisiológica), y al día 4 del tratamiento se perfundieron intracardiacamente con paraformaldehido 4% en b. fosfato 0,1 M. Se realizaron

inmunofluorescencias anti-NeuN para detectar neurodegeneración, anti-GFAP para evaluar reacción astrocitaria, lectinas para observar cambios en la microvasculatura, GB_3 para identificar los receptores de membrana para Stx2. Se capturaron imágenes por microscopía de fluorescencia y analizadas con el programa Image-J. Se realizaron los tests Anova y Bonferroni's Multiple Comparison para encontrar diferencias significativas entre los tratamientos. El número de núcleos neuronales con fenotipo anormal Gb_3 inmunopositivos fue significativo ($p<0.05$) para los animales tratados con Stx2 y Stx2+LPS respecto al vehículo y los tratados con Stx2 y Stx2+LPS respecto al LPS. La astrogliosis observada fue significativa ($p<0.05$) en los tratamientos de Stx2+LPS con respecto a los de Stx2. En la microvasculatura se observaron diferencias significativas ($p<0.05$) en el área ocupada por los microvasos en los tratamientos con LPS respecto al vehículo, de LPS respecto a Stx2+LPS, y Stx2 con respecto a Stx2+LPS. El tamaño promedio de los vasos presentó diferencias significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos con Stx2+LPS, Stx2 y LPS respecto al vehículo. Se concluye que la Stx2 afecta la unidad neurovascular de los núcleos talámicos, incluyendo astrogliosis, neurodegeneración y daño microvascular por la presencia de las neurotoxinas, y que el LPS exacerba el daño ocasionado al contribuir con procesos neurodegenerativos.

577 (662) LA LEVOCABASTINA, ANTAGONISTA DEL RECEPTOR NEUROTENSINÉRGICO NTS2, INHIBE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO Y AUMENTA LA CAPTACIÓN DE NORADRENALINA A NIVEL DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Alicia Angela Gutnisky[1]; Analia G. Karadayian[2]; Sandra Hope[3]; Marcelo Vatta[3]; Silvia Lores-Arnaiz[2]; Georgina Rodríguez De Lores Arnaiz[1]

Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. E. De Robertis", Facultad De Medicina, UBA.[1] Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA[2] Cátedra de Fisiología, IQUIMEFA-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA[3]

La neurotensina puede actuar como neuromodulador o como neurotransmisor. Sus receptores principales son el NTS1 y NTS2, que unen al péptido con alta y baja afinidad, respectivamente. La neurotensina modula la actividad de Na/K-ATPasa, enzima esencial para el mantenimiento de los gradientes iónicos. Las propiedades de la Na/K-ATPasa neuronal se modifican por la administración de L-NAME, inhibidor de la síntesis de óxido nítrico (NO) y por la administración de levocabastina, bloqueante del receptor NTS2. Con el objetivo de estudiar la posible interacción entre el receptor a la neurotensina NTS2 y la óxido nítrico sintasa (NOS), se administró levocabastina y se evaluó la actividad de la NOS en membranas sinaptosomales de corteza cerebral. Dada la estrecha relación entre los sistemas catecolaminérgicos y la neurotensina y considerando la acción de las catecolaminas sobre la actividad de la NOS, fue de interés estudiar la posible relación entre el receptor NTS2 y la captación de 3H-noradrenalina a cortes de hipotálamo. Se administró levocabastina (50 µg/kg, i.p., 30 min) o vehículo (solución fisiológica) a ratas Wistar macho. Parte de los animales se empleó para obtener membranas sinaptosomales de corteza cerebral mediante centrifugación diferencial y en gradiente y evaluar la actividad de NOS. De otro grupo de animales, se disecaron las porciones anterior y posterior del hipotálamo, que se procesaron para determinar la captación de 3H-noradrenalina. La actividad de la NOS en las membranas sinaptosomales disminuyó alrededor de 50% por el tratamiento con la levocabastina o por el agregado in vitro de levocabastina 10-5M. La administración de levocabastina produjo un aumento de 35% y de 12% en la captación de 3H-noradrenalina en hipotálamo anterior y posterior, respectivamente. Estos resultados sugieren una interrelación en el funcionamiento del receptor NTS2 con la regulación de la síntesis de NO y los niveles de noradrenalina a nivel del sistema nervioso central.