

SAIC
RESUMENES DE LAS COMUNICACIONES EN POSTERS

ENDOCRINOLOGIA A

- 138. Efecto del óxido nítrico (NO) sobre la secreción de cortisol estimulada por ACTH en células de la zona fasciculada bovina.** José Sainz, Nuria Miragaya, Miriam Rábano Miguel Trueba

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad del País Vasco, Bilbao, España.

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de dos diferentes dadores de NO, nitroprusiato de sodio (SNP) y deta-nonoato (NOC-18), en la secreción de cortisol estimulada por ACTH 10 nM en células de la zona fasciculada-reticular bovina en cultivo primario. **Resultados:** El SNP ocasionó una inhibición de un $37,1 \pm 7,8\%$ en la secreción de cortisol ($n=3$, $p<0,05$), mientras que el NOC-18 el $75,5 \pm 7,3\%$ ($n=3$, $p<0,01$), a una concentración de 1 mM. Cuando el dador fue incubado en presencia de hemoglobina la inhibición de la secreción de cortisol fue revertida de forma dosis-dependiente. La inhibición provocada por NOC-18 fue anulada con Hb 100 mM. Similares resultados se obtuvieron para el SNP. El estudio de la actividad adenilato ciclasa determinó que ni el SNP ni el NOC-18, afectaron de forma significativa la producción de AMPc estimulada por ACTH. Ambos dadores estimularon de manera dosis-dependiente la actividad guanilato ciclasa, incrementando los niveles de GMPc. Incubaciones en presencia de 8-Br-GMPc hasta 1 mM, no reprodujeron las acciones de los dadores de NO. **Conclusiones:** La inhibición de la secreción de cortisol estimulada por ACTH, provocada por los dadores de NO, en células fasciculada-reticulares bovinas, parece no estar mediada por el GMPc. Financiado por Gobierno Vasco (PI97-61) y CAICYT (PB97-0601).

- 139. Frecuencia de la mutación r483fs del gen cyp21b en población argentina.** Andrea Dardis, Roxana Marino, Ariel Roldán, Ignacio Bergadá, Marco Rivarola, Alicia Belgorosky

Laboratorio de Investigación, Hospital Garrahan y Servicio de Endocrinología, Hospital de Niños R. Gutierrez, Buenos Aires.

El cambio de 2G por C en el codón 483 (R483fs) del gen CYP21B, ha sido descrito en un solo paciente en población sueca (Weddell y col.1992). Sus efectos sobre la actividad de la enzima 21 hidroxilasa, no han sido determinados. Sin embargo, dado que este cambio generaría un corrimiento del marco de lectura abierto, probablemente de lugar a la formación de una proteína con una actividad enzimática alterada. Se determinó la frecuencia de R483fs en pacientes con HSC por déficit de la P450c21 y evaluar su presencia en sujetos normales. La presencia de R483fs fue analizada por hibridación con oligonucleótidos alelo específicos (ASO), en 73 pacientes no relacionados (146 alelos) y en 70 individuos normales (140 alelos). Los resultados fueron confirmados por secuenciación directa. En 2 pacientes con la forma perdedora de sodio se halló R483fs (genotipos: R483fs/Ex y R483fs/R356W) representando el 2.74% de la población y el 1.37% de los alelos. Debido a que los segundos alelos correspondían a una mutación asociada a forma perdedora de sodio, la clínica de los pacientes sugiere que la P450c21 generada por el gen CYP21B con el codón 483 alterado tendría una actividad enzimática mínima. La R483fs no fue detectada en los individuos

normales, sugiriendo que no sería una variante polimórfica de alta frecuencia en la población normal, sino una mutación responsable de la patología.

- 140. Efecto del estrés sobre la actividad de la 11 β -hidroxisteroide dehidrogenasa 2 (11 β HSD2) en animales adrenalectomizados.** Marisa Zalocchi, Pilar Igarreta, Juan Carlos Calvo, Cristina Damasco

Programa de Regulación Hormonal y Metabólica. CONICET, Universidad de Buenos Aires.

La enzima 11 β -hidroxisteroide dehidrogenasa 2 (11 β HSD2) renal metaboliza corticosterona (glucocorticoide activo) a 11-dehidrocorticosterona (glucocorticoide inactivo), otorgando especificidad al receptor a mineralocorticoides. En estudios previos observamos que el estrés agudo provocado por canulación de estómago o por sobrecarga gástrica con cloruro de sodio, producía un aumento de la actividad de esta enzima. El presente trabajo tiene como finalidad determinar si este aumento depende de los niveles circulantes de glucocorticoides. Con este fin, utilizamos 4 grupos de ratas: Sham (operación simulada) basales, adrenalectomizadas (ADX) basales, ADX con estrés producido por canulación de estómago (ADX + sonda) y ADX sometidos a sobrecarga con cloruro de sodio 0,25% (ADX + NaCl). Resultados: Vmax: Sham basales $4,82 \pm 0,67$; ADX $5,24 \pm 0,40$; ADX + sonda $11,18 \pm 0,99^*$ y ADX + NaCl $11,38 \pm 2,43^*$ pmoles/min/mg proteínas (* $p < 0,001$ versus sham). Conclusión: El aumento de la actividad de la 11 β HSD2 renal producido por estrés agudo, parece no estar modulado por los glucocorticoides circulantes.

- 141. Efecto de ACTH sobre la 11 β -hidroxisteroide deshidrogenasa adrenal de rata.** Damián Romero, Eduardo Cozza

Programa de Regulación Hormonal y Metabólica. Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

La 11 β -hidroxisteroide deshidrogenasa (11 β -HSD) cataliza la conversión del glucocorticoide (GC) activo corticosterona (B) en su derivado inactivo la 11-dehidrocorticosterona (A). Se han clonado dos isoformas de 11HSD y su función es regular el acceso de los GC tanto a los receptores de mineralocorticoides como de GC. La adrenal expresa ambas isoformas de 11 β -HSD y se desconoce su rol fisiológico. Se realizaron tratamientos *in vivo* (infusiones e inyecciones) e *in vitro* (células dispersas de fasciculata adrenal) con ACTH. Se determinó la actividad enzimática de 11 β -HSD con sustratos radioactivos y, los niveles proteicos y de mRNA por Western-blot y Northern-blot respectivamente. Los niveles de B y A se determinaron por radioinmunoensayo. ACTH agudo *in vivo* produjo una disminución del 63% para 11 β -HSD-1 ($9,38 \pm 0,77$ vs. $3,48 \pm 1,07\%$ conversión, Media \pm ES, $n=3$, $p>0,05$) y 72% para 11 β -HSD-2 ($27,96 \pm 0,24$ vs. $7,80 \pm 1,23\%$ conversión, Media \pm ES, $n=3$, $p>0,005$). ACTH crónico *in vivo* produjo un aumento en la actividad de 11 β -HSD-2 ($7,64 \pm 0,70$ vs. $26,94 \pm 1,93\%$ conversión, Media \pm ES, $n=3$, $p>0,005$) mediado por un aumento de los niveles de mRNA y proteína. ACTH redujo la actividad de 11 β -HSD en células de fasciculata adrenal ($17,3 \pm 0,4$ vs. $9,7 \pm 0,1\%$ conversión, Media \pm ES, $n=6$, $p>0,001$). Se postula que 11 β -HSD modula los niveles de GC activos que son secretados por la adrenal estimulada con ACTH.

142. Análisis multivariado de variables determinantes de la DMO lumbar en una población de mujeres posmenopáusicas. Ana Masoni, Mario Morosano, Fabiana Bentancur, Ricardo Di Masso, Roberto Bocanera, Roberto Tozzini, Rodolfo Puche

Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario.

Un conjunto de variables extraídas de las historias clínicas se analizaron con el objeto de definir su relación con el DMO de 99 pacientes menopáusicas (45 a 80 años), concurrentes al Centro de Estudios del Climaterio. La variable dependiente fué DMO L2-L4 (g/cm²) medida por DXA, y las independientes: edad, peso, talla, años de menopausia, ingestas calóricas (kcal/d), de Ca y P (mg/d), de proteínas y fibra (g/d), de vitaminas C y D (UI/d), actividad física (kcal/d), paridad, lactancia, consumo de alcohol, tabaco y café, obtenidas por anamnesis y examen físico. Los datos se analizaron por medio de regresiones simples y múltiples. La DMO se correlacionó negativamente con la duración de la menopausia ($r=0.29$, $P=0.0033$) y positivamente con la ingesta de calcio ($r=0.29$, $P=0.0033$), de fósforo ($r=0.32$, $P=0.001$), de proteínas ($r=0.26$, $P=0.008$), calorías/d ($r=0.20$, $P=0.003$), BMI ($r=0.52$, $P=0.0001$) y actividad física ($r=0.45$, $P=0.0001$). El análisis multivariado "stepwise" reveló que el conjunto de variables incluídas en el análisis explica el 48% de la variancia de la DMO. Las de mayor impacto fueron ingesta de Ca, BMI actividad física y años de menopausia. Los resultados sugieren que de las variables analizadas, la calidad de la dieta, textura y actividad física tienen una moderada influencia sobre la DMO lumbar. Los bajos coeficientes de correlación parcial se explican porque la masa ósea está determinada principalmente por la carga genética.

143. Efectos del acetato de medroxyprogesterona (depot) sobre el metabolismo calcico de ratas castradas. Eriberto Roveri, Gustavo Chapo, Irene Grappiolo, Rodolfo Puche.

Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario.

El objetivo de este trabajo fue investigar el efecto del acetato de medroxyprogesterona (DMPA) sobre el metabolismo calcico de ratas castradas. El tratamiento con DMPA (aislado o asociado con estrógenos) es frecuente en mujeres menopáusicas. Su efecto sobre el tejido óseo, sin embargo, es materia de debate. Ratas adultas (250 g de peso) fueron ooforectomizadas bajo anestesia etérea. Una semana después, los animales (T, n=6) recibieron 15 mg de DMPA por vía im, una vez por semana durante doce semanas. Los controles (n=6) recibieron solvente. Las tasas diarias de absorción y excreción intestinal de Ca, las de deposición y absorción óseas así como el tamaño y las tasas de intercambio de los "pooles" de calcio intercambiable fueron estimados con el auxilio de ⁴⁵Ca de acuerdo con Aubert and Milhaud (1960). El tratamiento produjo niveles séricos de 46.5 ± 5.6 nmoles of medroxyprogesterona/L ($P<0.00001$) y aumentó la absorción verdadera de calcio (C: 36.2 ± 6.7 mg Ca/d, T: 52 ± 6.0 , $P=0.051$) y la excreción de Ca fecal endógeno (C: 13.5 ± 3.2 mg Ca/d, T: 30.2 ± 4.0 , $P=0.038$), redujo la deposición de calcio en el esqueleto (C: 12.2 ± 0.6 mg Ca/d, T: 8.7 ± 0.3 , $P=0.0004$) y el tamaño del compartimiento de intercambio lento de Ca (C: 22.7 ± 1.7 mg Ca/g Ca esq, T: 16.0 ± 0.6 ; $P=0.004$). Conclusión: las modificaciones producidas por el tratamiento se estiman fútiles porque no modificaron la masa ósea ($T=0.72 \pm 0.03$ g Ca/100 g peso, $C=0.70 \pm 0.03$).

144. Identificación de variables relacionadas con la DMO lumbar en mujeres menopáusicas osteoporóticas (O), osteopénicas (E) y normales (N). Mario Morosano, Ana Masoni, Florencia Tomat, Ricardo Di Masso, Roberto Bocanera, Roberto Tozzini, Rodolfo Puche

Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Rosario.

Un conjunto de variables extraídas de las historias clínicas se analizaron con el objeto de definir su relación con el DMO de

pacientes menopáusicas clasificadas como E (n:42), O (n:42), y N (n:27) según los criterios densitométricos de la OMS. La variable dependiente fué DMO L2-L4, expresada en g/cm², y las independientes: edad, BMI, años de menopausia, ingesta calórica (kcal/d), de Ca y P (mg/d), de proteínas y fibra (g/d), de vitaminas C y D (UI/d), actividad física (kcal/d), consumo de alcohol, tabaco, café, paridad y lactancia. Se realizó el análisis multivariado en cada subpoblación con el objeto de seleccionar las variables de mayor influencia sobre la variancia del DMO (VDMO). En N el total de las variables estudiadas explican el 68% de VDMO (63% es determinada por BMI, ingesta de Ca, P y años de menopausia). En E, todas las variables explican el 57% de la VDMO (33% es explicada por BMI, paridad e ingesta de fibra). En O, el total de las variables explica el 40% de la VDMO (24% es explicada por la actividad física y BMI). El grupo O posee un 22% de nulíparas vs. 5% de N+E ($c^2=6.66$, $P<0.001$). Se concluye que a medida que se consideran poblaciones de menor masa ósea (N>E>O), disminuye la influencia de las variables vitales sobre la DMO. La contribución de las variables seleccionadas a la DMO, tiene mayor peso en los sujetos con masa ósea normal que en aquellos con masa ósea deteriorada.

145. Regulación del factor de crecimiento insulino-símil tipo I (IGF-I) y sus proteínas ligadoras (IGFBP) por productos de glicación avanzados (PGA): rol en el desarrollo osteoblástico. Antonio McCarthy, Susana Etcheverry, Ana Cortizo

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

El aumento de proteínas modificadas por PGA (PGA-proteínas) en la Diabetes mellitus descompensada, induce la secreción de citoquinas y factores de crecimiento en diferentes tejidos. Hemos encontrado previamente que PGA-proteínas regulan la proliferación y diferenciación de las células osteoblásticas MC3T3E1. Describimos también la existencia de receptores específicos para PGA en estas células. En el presente trabajo, investigamos los efectos de PGA-proteínas sobre la secreción de IGF-I e IGFBP por los osteoblastos MC3T3E1. Dichas células fueron estudiadas a través de sus etapas sucesivas de desarrollo: proliferación, diferenciación y mineralización. En cada caso, las células se incubaron 24 horas con diferentes concentraciones de albúmina sérica bovina (ASB) o PGA-ASB. El IGF-I secretado al medio se separó de las IGFBP por gel filtración/centrifugación en medio ácido, y se dosó luego por radioinmunoensayo. Los IGFBP se analizaron por un Ligand Blot semicuantitativo. PGA-ASB (100-500 µg/mL) inhibió la secreción de IGF-I en un 45-55% con respecto al basal ($p<0.05$) (estadio de proliferación). Estos osteoblastos secretan principalmente una IGFBP de 30 kDa, la cual fue estimulada a altas dosis de PGA-ASB (200-500 µg/mL) en las etapas de proliferación y mineralización celular (120-134% del basal; $p<0.02$ - $p<0.001$). Estos resultados sugieren que la modulación del crecimiento osteoblástico inducido por PGA-proteínas, podría deberse a cambios en el sistema IGF/IGFBP.

146. Efectos de la dexametasona sobre la producción y depuración metabólica de progesterona durante la fase lútea en el primate Cebus. Mónica Lahoz, Carlos Nagle, Margarita Porta, Marta Torres, Silvia Quiroga, Armando Mendizabal

Centro de Investigación Reproducción Humana y Experimental CEMIC, Buenos Aires.

Los glucocorticoides suprimen los niveles preovulatorios de progesterona (P) en primates. En este trabajo se evaluaron los efectos de dexametasona (DEX) en la fase lútea (FL) sobre los niveles de P ováricos y periféricos y su depuración metabólica, en monas Cebus con ciclos regulares. Se administró: I- DEX 2mg/kg/12hs, i.m. (n=5) o su vehículo (n=8) desde el día 1 de la FL hasta la menstruación. Se obtuvieron muestras diarias de sangre femoral. II- DEX 4 mg/kg (n=3) en día 3 de FL o su vehículo (n=3), más 10 mg/kg de P i.m., una hora después. Se obtuvo

sangre de vena femoral a 0, 2, 4 y 24 hs post-inyección de P. III- Laparotomía y DEX 2mg/kg i.v. (n=2). Se tomaron muestras de sangre de ambas venas ováricas y de femoral a tiempos 0, 30, 60 y 120 min después de DEX. En todos los grupos se dosaron los niveles plasmáticos de P y cortisol (C) por RIA. DEX suprimió C a valores inferiores al 5% de los contro-les. DEX disminuyó P desde día 4 (109 ± 33 ng/ml) a $4,6 \pm 2,7$ ng/ml precediendo la menstruación, que se adelantó 3 días (DEX: $8,4 \pm 1,0$ días vs control: $11,3 \pm 3,2$ días). DEX incrementó la depuración metabólica de P (2hs DEX 252 ± 69 ng/ml vs control 782 ± 230 ng/ml). La producción de P ovárica fue inhibida en un 30% a los 30 min de inyectada la DEX. Se sugiere un efecto deletéreo de DEX sobre la FL disminuyendo los niveles de P por inhibición de la producción ovárica y aceleración de la eliminación metabólica del esteroide.

147. Efectos de la Dexametasona sobre el desarrollo folicular y la ovulación en el primate Cebus. Mónica Lahoz, Carlos Nagle, Margarita Porta, Silvia Quiroga, Zulema Farinati, Armando Mendizabal.

Centro de Reproducción Humana y Experimental, CEMIC, Buenos Aires.

Los glucocorticoides ejercen efectos adversos sobre la reproducción. En este trabajo se evaluó el efecto de dexametasona (DEX) sobre la ovulación de monas Cebus con ciclos menstruales regulares. Se administró DEX 2mg/kg/12hs, i.m: I- desde día 1 de fase folicular (FF) hasta día 1 de fase lútea (FL), n=4. II- durante FF temprana (días 1-3), media (día 4 FF a 1FL) y tardía (día 7 FF a 1 FL), n=4. III-Controles: n=8. A todos los grupos, en muestras diarias de sangre se les dosó: estradiol (E), progesterona (P) y cortisol (C). En el grupo II se evaluó el desarrollo folicular y la ovulación por laparoscopías seriadas. DEX suprimió los niveles de C (72 ± 8 µg/100ml) a valores que oscilaron entre 1 y 5 µg/100ml. La concentración de E no fue alterada. Sin embargo, los niveles medios de P se redujeron significativamente por el tratamiento a valores que variaron entre $0,7 \pm 0,2$ y $1,7 \pm 0,7$ ng/ml versus $2,0 \pm 0,2$ y 32 ± 3 ng/ml en animales controles. DEX bloqueó el aumento preovulatorio de P, observado en el grupo control. Las laparoscopías revelaron un desarrollo folicular normal bajo tratamiento con DEX pero la ruptura folicular se alteró cuando el tratamiento se inició durante la FF media, con un estigmas atípicos simples o dobles, sugiriendo una falla en la evacuación del óvulo. Estos resultados indican que DEX interfiere con la ruptura folicular y la ovulación asociado a una supresión de los niveles foliculares e inhibición del aumento preovulatorio de P.

148. Leptina: posibles efectos directos sobre células testiculares. Eliana Pellizzari, Silvina Meroni, Selva Cigorraga

Centro de Investigaciones Endocrinológicas. Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez. Buenos Aires.

Se ha demostrado "in vivo" que la leptina (Lep) posee un efecto estimulador sobre la función reproductiva y estudios "in vitro" mostraron efectos directos sobre células ováricas. El objetivo del presente trabajo fue estudiar posibles efectos directos de Lep sobre células de Leydig y de Sertoli. En células de Leydig de rata adulta la presencia de Lep (500ng/ml) no modificó la producción de testosterona (T) basal y provocó una inhibición de la T estimulada por hCG (10ng/ml) que fue observada solamente en tiempos cortos de incubación (90min. hCG: $21,6 \pm 1,4$; hCG+Lep500: $14,6 \pm 3,9^*$; 180min. hCG: $42,0 \pm 15,9$; hCG+Lep500: $42,0 \pm 9,6$; 24hs. hCG: $160,8 \pm 14,8$; hCG+Lep500: $138,2 \pm 7,5$ ng/10⁶cél, *p<0,05). En células de Sertoli de rata de 20 días de edad Lep (1; 10; 100; 500ng/ml) no modificó la producción de lactato (Lac) y la actividad de gamma-glutamiltanspeptidasa (γ-GTP) en condiciones basales (B) o con FSH (100ng/ml) (Lac: B: $15,8 \pm 2,4^a$; Lep500: $16,8 \pm 4,7^a$; FSH: $21,3 \pm 2,0^b$; FSH+Lep500: $25,0 \pm 1,2^b$ µg/µgADN; y γ-GTP: B: $23,6 \pm 4,3^c$; Lep500: $20,6 \pm 1,5^c$; FSH: $39,6 \pm 5,9^d$; FSH+Lep500: $32,5 \pm 4,0^d$ pmol/µg ADN/min; diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas, p<0,05). No pueden descartarse otros efectos directos sobre la célula de Sertoli, que no han sido puestos en evidencia en las

condiciones experimentales usadas. Los resultados obtenidos sugieren que en la rata Lep modula la actividad esteroideogénica de la célula de Leydig en los momentos iniciales post-estímulo con gonadotropina.

149. Regulación de la actividad y distribución de isoformas de LDH por FSH e IL1β en células de Sertoli. Fernanda Riera, Gabriela Gómez, Silvina Meroni, Selva Cigorraga

Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Hospital de Niños "R. Gutiérrez", Buenos Aires.

En el tubo seminífero las células germinales postmeióticas utilizan lactato como fuente de energía. Las células de Sertoli serían la principal fuente de este sustrato energético. El objetivo de este trabajo fue analizar el mecanismo por el cual FSH e IL1β regulan la producción de lactato. Se utilizaron cultivos de células de Sertoli de rata de 20 días de edad. Los resultados se expresan como X ± DS, n=3, *p<0.01. Se observó que tanto FSH (100 ng/ml) como IL1β (50 ng/ml) aumentan la producción de lactato (basal: $18,2 \pm 2,5$; FSH: $40,3 \pm 3,2^*$; IL1β: $48,7 \pm 4,6^*$, µg/µgDNA). Se determinó en estos cultivos la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) observándose un estímulo de la misma por ambos tratamientos (basal: $31,8 \pm 3,2$; FSH: $45,1 \pm 3,8^*$; IL1β: $57,3 \pm 1,9^*$, mUI/µgDNA). El análisis electroforético de las isoformas de LDH presentes en estos cultivos reveló que tanto FSH como IL1β aumentan la proporción de la isoforma LDH5 constituida por 4 subunidades A. Esta isoforma tiene la propiedad de favorecer la conversión de piruvato a lactato. Se concluye que en células de Sertoli el aumento en la producción de lactato ejercido por FSH e IL1β es consecuencia, al menos en parte, de un incremento en la actividad de LDH que se acompaña con una redistribución de las isoformas de la misma.

150. Regulación por fosfolipasa A₂ (PLA₂) y D (PLD) de la producción de lactato y la actividad de γ-glutamiltanspeptidasa (γGTP) en células de Sertoli. Gabriela Gomez, Fernanda Riera, Eliana Pellizzari, Silvina Meroni, Selva Cigorraga

Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Hospital de Niños "R. Gutiérrez", Buenos Aires.

La célula de Sertoli se encuentra bajo el control de FSH y de un conjunto de factores proteicos de producción local. Tanto la PLA₂ como la PLD resultan activadas como consecuencia de ciertas interacciones ligando-receptor. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de estas fosfolipasas sobre la actividad metabólica de las células de Sertoli. Cultivos de células de Sertoli de ratas de 20 días de edad fueron estimulados por 3 días con PLA₂ (10 UI/ml) y PLD (10 UI/ml). Se determinaron los niveles de lactato y γGTP en condiciones basales y bajo estímulo con FSH (100ng/ml). Los resultados obtenidos se expresan como X ± DS de incubaciones realizadas por triplicado en un experimento representativo de tres. **Lactato:** basal: $11,9 \pm 1,8$; PLA₂: $27,6 \pm 2,1^{*1}$; PLD: $18,0 \pm 0,5^{*1}$; FSH: $22,7 \pm 4,7^{*1}$; FSH+PLA₂: $49,3 \pm 2,0^{*1,2}$; FSH+PLD: $25,2 \pm 2,4^{*1}$ µg/µgDNA y **γGTP:** basal: $21,7 \pm 2,9$; PLA₂: $35,5 \pm 1,7^{*1}$; PLD: $24,7 \pm 1,6$; FSH: $29,9 \pm 4,2^{*1}$; FSH+PLA₂: $39,5 \pm 3,1^{*1,2}$; FSH+PLD: $27,8 \pm 1,6^{*1}$ pmol/µgDNA/min; *p<0,01; ¹vs basal y ²vs FSH. Estos resultados muestran que la producción de lactato aumenta por el agregado exógeno de PLA₂ y PLD, mientras que la actividad de γGTP sólo aumenta por el agregado de PLA₂.

151. Efecto de las poliaminas sobre las células de Sertoli de Hamster adultos regresionados por fotorrestricción. Helena Scheingart¹, Selva Cigorraga¹, Ricardo Calandra^{2,3}, Silvia Gonzalez-Calvar^{2,4}.

1-Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Hospital de Niños R. Gutiérrez; 2-Instituto de Biología y Medicina Experimental; 3-Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata; 4-Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

La exposición de Hamsteres dorados (*Mesocricetus Auratus*) adultos a 6hs: 18hs, luz: oscuridad, durante 14 semanas induce una regresión gonadal máxima, mostrando variaciones en los niveles testiculares de poliaminas (PA)(J.Androl.17:623,1996). En este trabajo se estudia la influencia de las PA sobre la funcionalidad de las células de Sertoli (SC) evaluando la actividad de γ -glutamil transpeptidasa (γ -GTP) y la producción de lactato (LACT). SC de Hamsteres adultos regresionados fueron aisladas y cultivadas durante 7 días en medio químicamente definido, en presencia o ausencia de o-FSH y/o distintas dosis de PA: putrescina (Pu); espermidina (Ed) y espermina (Ep). Se determinó γ -GTP sobre la monocapa celular luego de 4 días de tratamiento (pmol/ μ gADN/ min) y LACT se midió en el medio de cultivo condicionado por 72hs (μ g/ μ gADN). La curva dosis-respuesta a FSH (0,1-1000 ng/ ml) mostró un $ED_{50}=0,74\pm 0,03$ ng/ml para γ -GTP y $36,03 \pm 1,27$ ng/ml para LACT. En condiciones basales, el tratamiento con PA produjo aumentos significativos en la actividad de γ -GTP: Con-trol: $166.8 \pm 5,5$; Ep: $214,2 \pm 1,5^*$; Ed: $227,45 \pm 6,5^*$; Pu: $232,4 \pm 2,1^*$. (1mM, * $p<0,05$). Ep incrementó significativamente la γ -GTP en presencia de FSH (1000ng/ml): FSH: $217,6 \pm 3,5$; FSH+Ep: $337,7 \pm 3,6^*$ (* $p<0,05$). Las PA no indujeron modificaciones en LACT. En conclusión, las PA modulan la actividad funcional de SC en hamsteres adultos regresionados sugiriendo su participación en la reinitación de la actividad gonadal.

ENDOCRINOLOGIA B

152. Efecto de las poliaminas sobre las células de Sertoli de Hámster inmaduros. Helena Scheingart¹, Selva Cigorraga¹, Ricardo Calandra^{2,3}, Silvia Gonzalez-Calvar^{2,4}

¹ Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Hospital de Niños R. Gutiérrez; ² Instituto de Biología y Medicina Experimental; ³ Facultad de Ciencias Exactas, UNLP; ⁴ Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Las poliaminas (PA) están involucradas en los procesos de crecimiento celular, duplicación y diferenciación. En este trabajo se estudia la influencia de las PA sobre la funcionalidad de las células de Sertoli (SC) de hamsteres dorados de 20 días de edad, evaluando la actividad de γ -glutamil transpeptidasa (γ -GTP) y la producción de lactato (LACT). SC fueron aisladas y cultivadas durante 7 días en medio químicamente definido, en presencia o ausencia de o-FSH y/o distintas dosis de PA: putrescina (Pu); espermidina (Ed) y espermina (Ep). Se determinó γ -GTP sobre la monocapa celular luego de 4 días de tratamiento (pmol/ μ gADN/ min) y LACT en el medio de cultivo condicionado por 72hs (μ g/ μ gADN). En condiciones basales o con estímulo de FSH(1 μ g/ml), Ep (1mM) produjo aumentos significativos en γ -GTP: Control: $75.3 \pm 2,3$; Ep: $105,8 \pm 7,5^*$; FSH: $107,9 \pm 3,4$; FSH+Ep: $157,1 \pm 13,6^*$ (* $p<0,05$). Resultados similares se observaron para LACT: Control: $11,6 \pm 0,7$; Ep: $14,7 \pm 0,5^*$; FSH: $23,2 \pm 1,5$; FSH+Ep: $35,0 \pm 2,3^*$ (* $p<0,05$). Además Ep incrementó la incorporación de ³H-Uridina (URID) a ARN (* $p<0,05$). En condiciones basales o estimuladas con FSH no se observaron modificaciones en sendos parámetros por efecto de Ed y Pu. En conclusión los aumentos en γ -GTP, LACT y URID en SC promovidos por Ep sugieren su participación en los cambios madurativos que esta célula sufre en el momento de iniciarse la espermatogénesis.

153. Neuropeptidos modifican el efecto de las secreciones de esplenocitos sobre la esteroidogénesis ovárica. Myriam Forneris, Liliana Oliveros, Ana M. Rastrilla, Luis Aguado

Laboratorio de Biología de la Reproducción. Universidad Nacional de San Luis.

Hemos mostrado interacción entre el sistemas: nervioso simpático, vía norepinefrina (NE) y el sistema inmune sobre la funcionalidad del ovario, ahora estudiamos *in vitro* como las secreciones de esplenocitos (ES) tratados con péptido intestinal vasoactivo (VIP) y neuropeptido Y (NPY), modifican la esteroidogénesis ovárica. Se trabajó con ES de ratas Holtzman de 60 días de edad (diestro 2) con el nervio ovárico superior seccionado

(NOSs) a los 53 d. de edad y controles, con operación simulada. Los ES se incubaron por 24 hs en medio RPMI, con 10% FSA y antibióticos, luego se cultivaron por 24 hs con y sin VIP y NPY (10^{-6} M) respectivamente. Luego el medio se reemplazó por medio fresco por 24 hs el cual se colectó para estimular ovarios de ratas de 60 d controles intactas en ensayos de incubación. La progesterona (P), estradiol (E) y androstenodiona (A) liberados al medio se midieron por RIA, en pg/mg tej. Secreciones de ES controles + NPY producen caída de P, A y E ($p<0.025$) y +VIP: caída de E ($p< 0.001$), respecto a ES no tratados. Secreciones de ES-NOSs producen: 1) disminución de P (0.9 ± 0.07 vs 1.4 ± 0.1), aumento de E (15 ± 1 vs 8 ± 0.02) y sin cambio en A (0.2 ± 0.01 vs 0.2 ± 0.01); respecto a ES controles; 2) + VIP o NPY la P se restablece (1.3 ± 0.07 y 1.5 ± 0.08), E disminuye (6.4 ± 0.04 y 5.3 ± 0.1) y A no cambia con VIP pero cae con NPY (0.01 ± 0.006). Neuropeptidos diferentes a NE participarían involucrados en la modulación de la producción de factor/s desde los ES que afecta la esteroidogénesis ovárica.

154. Respuesta ovárica a la estimulación ganglionar peptidérgica en ratas *in vitro* en diestro II. Marisa Garraza, Nelson Villegas, Luis Aguado

Laboratorio de Biología de la Reproducción. Universidad Nacional de San Luis.

En algunos mamíferos existen receptores de sustancia P (SP), de péptido intestinal vasoactivo (VIP) y de neuropeptido Y (NPY) en ganglios simpáticos (Matyh y col 1992; Tajti y col 1999). Se estudió si la acción de estos péptidos sobre el Ganglio Celíaco (GC), modifica la liberación de Progesterona (P) y Androstenodiona (An) ováricas en diestro II. A ratas hembras Holtzman de 250 ± 25 g, bajo anestesia, se les extrajo el sistema GC-Nervio Ovárico Superior (SON)-Ovario (O), colocándose en celdas separadas el O y el GC unidos por el SON. El sistema se incubó en buffer Krebs-Ringer, a 37 °C en baño metabólico, con el agregado individual previo en la celda ganglionar de los distintos péptidos y se determinó, por RIA, la concentración de P y An en el líquido de incubación del O, a los 30, 60, 120, 180 min. Se toman como valores basales los obtenidos sólo con buffer en ambas celdas. Resultados: (medias \pm SEM ng/ml) P basal 30' = $0,015 \pm 0,002$; 60' = $0,027 \pm 0,008$; 120' = $0,027 \pm 0,004$; 180' = $0,04 \pm 0,007$. Con NPY, VIP y SP, aumenta la liberación de P en todos los tiempos ($p<0.05$). An (medias \pm SEM pg/ml) basal: 30'= $4,17 \pm 0,5$; 60' = $5,72 \pm 0,62$; 120' = $7,11 \pm 0,96$; 180' = $16,7 \pm 3,05$. Con SP la liberación de An disminuye significativamente en todos los tiempos ($p<0.05$). Con NPY y VIP, An solo disminuye a los 180' ($p<0.025$). Los resultados sugieren que VIP, NPY y SP actúan sobre el GC produciendo, a través del SON, modificaciones en la liberación de P y An ováricas en diestro II. El efecto opuesto sobre P respecto de An, sugiere la inhibición de enzimas que inducen la formación de An a partir de P.

155. Efecto proliferativo de líquidos quísticos mamarios sobre líneas celulares mamarias humanas. Pablo Enriori¹, Stella Vázquez¹, Violeta Chiauzzi¹, Carlos Fischer², Jorge Gori², Alberto Etkin³, Eduardo Charreau¹, Ricardo Calandra¹, Isabel Luthy¹

¹ Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET, ² Hospital Alemán, ³ Hospital C. Durand, Buenos Aires

La enfermedad macroquística mamaria no es considerada pre-neoplásica, aunque se ha demostrado que estas pacientes exhiben un mayor riesgo de desarrollar un carcinoma mamario (Eur. J. Cancer 26: 555-7, 1990). El objetivo del presente trabajo fue evaluar si la incubación con líquidos quísticos (LQ) producía algún efecto sobre la proliferación de una línea celular no tumoral y una tumoral de mama humana para elucidar este riesgo aumentado de carcinoma. Para ello, se incubaron células MCF-10A (no tumorales) y MCF-7 (tumorales) con 2,5 a 15 μ l de LQ y se evaluó la incorporación de Timidina [³H]. Se determinaron también las concentraciones de EGF, estradiol, estrona y sus sulfatos por RIA. Los 20 LQ estimularon ($2,7 \pm 0,28$ veces, Media \pm SEM, $p<0,001$)

las células MCF-10A y sólo 11 lo hicieron en las MCF-7 (2,07 ± 0,37 veces), resultando 6 inhibitorios en éstas. La concentración de EGF (133,2 ± 23,8 ng/ml) en los LQ es suficiente para producir estimulación máxima en las células MCF-10A. El crecimiento de MCF-7 correlacionó ($p < 0,05$) con la concentración de estrona (24,1 ± 0,92 pg/ml), estradiol (9,74 ± 2,2 pg/ml) y EGF determinadas en los líquidos. Demostramos que los LQ son capaces de estimular líneas mamarias humanas tanto no tumorales como tumorales, de acuerdo con sus concentraciones de EGF y/o estrógenos, dando una posible explicación para el riesgo aumentado de carcinoma.

156. Secreción de proteínas por tejido oviductal humano *in vitro*. Ileana Quintero, Sergio Ghersevich, María José Munuce, A Caille, SM Daniele, L Morisoli

Laboratorio de Estudios Reproductivos. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario.

El oviducto es capaz de secretar proteínas que integran el medioambiente de la luz tubaria. En este estudio se realizó la caracterización electroforética de las proteínas del medio condicionado de cultivos de tejido oviductal humano. Tejidos de la zona del ampulla y del istmo se cultivaron por separado para identificar posibles diferencias en el patrón proteico. El cultivo del tejido oviductal proveniente de pacientes hospitalarias premenopáusicas sin patología tubaria se realizó en medio HamF12-DMEM (1:1), suplementado con antibióticos y suero fetal bovino por 48 hs. Luego se prosiguió el experimento en medio libre de suero por 24 hs adicionales. Las proteínas se analizaron por SDS/PAGE en condiciones reductoras. No se observaron diferencias en el número de bandas proteicas detectadas en los medios condicionados provenientes de los cultivos del tejido del ampulla y del istmo. La producción proteica *de novo* se estudió usando marcación con ^{35}S met. Las proteínas marcadas con ^{35}S met fueron sujetas a Western blot y autorradiografiadas. El análisis de las proteínas producidas *de novo* indicó la presencia de al menos 13 bandas proteicas, siendo 5 de ellas no equiparables con bandas proteicas presentes en suero humano. Los PM estimados de dichas bandas fueron 122 kDa, 106 kDa, 35 kDa, 31 kDa y 17 kDa. Los resultados indican la producción por el tejido oviductal de al menos 5 proteínas específicas en nuestras condiciones de cultivo, que no estarían presentes en suero. La proteína de mayor PM podría corresponder a la proteína asociada al estro detectada en secreciones oviductales *in vivo*.

157. Actividad de óxido nítrico sintasa y liberación de LH-RH en ratas hembra y macho. Efecto de los estrógenos. Roxana Reynoso, Valeria Rettori, Silvia Carbone, Berta Szwarcfarb, Osvaldo Ponzio, Alejandro Lomniczi y Jaime Moguilevsky

Instituto de Fisiología. Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Universidad de Buenos Aires - CEFYBO, Buenos Aires

Se ha demostrado la participación de NO en la liberación de LH-RH, por un mecanismo mediado por prostaglandinas. En el presente trabajo se evaluó: a) la liberación de LH-RH (método de RIA) "in vitro" en incubaciones de hipotálamo medio basal (HMB) de ratas hembra y macho controles de 15 días (peripúberes) y 30 días (peripúberes) y en hembras prepúberes estrogenizadas; b) la actividad de cNOS (óxido nítrico sintasa) en homogenatos de tejido (método de ^{14}C Arg), en los mismos grupos experimentales ($n = 6-9$). Los resultados de LH-RH fueron expresados en pg/ml y la actividad de cNOS en pmoles NO/10 min./HMB. Se observó mayor liberación de LH-RH ($p < 0,0002$) (30 días: $2,44 \pm 0,15$ vs 15 días: $1,12 \pm 0,14$) y actividad enzimática ($p < 0,0001$) (30 días: $15 \pm 3,2$ vs 15 días: $88,06 \pm 2,9$) en hembras peripúberes. También el pretratamiento de hembras prepúberes con estrógeno aumentó los valores de LH-RH ($p < 0,03$) (15 días+E: $2,07 \pm 0,3$ vs 15 días: $1,12 \pm 0,14$) y cNOS ($p < 0,02$) (15 días+E: $100 \pm 3,5$ vs 15 días: $88,06 \pm 2,9$) no encontrándose diferencias con respecto

a las peripúberes. En ratas macho no hubo diferencias significativas en la liberación de LH-RH ni en la cNOS durante la maduración sexual. Los resultados indican que los estrógenos modularían la actividad de cNOS en hembras, promoviendo un aumento de LH-RH. Además existiría un mecanismo diferente de regulación de la actividad de cNOS en ambos sexos.

158. Caracterización de receptores serotoninérgicos en células de Leydig del hámster Dorado. Mónica Frungieri^{1,2}, Karina Zitta¹, Omar Pignataro¹, Silvia Gonzalez-Calvar^{1,2}, Ricardo Calandra^{1,3}

¹ Instituto de Biología y Medicina Experimental-Conicet; ² Cátedra Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; ³ Cátedra de Endocrinología, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata

Recientemente hemos descrito la presencia de serotonina (5-HT) en mastocitos y células de Leydig, y su efecto inhibitorio sobre la producción de testosterona (T) en el hámster Dorado (Frungieri y col., Neuroendocrinology 69: 299-308, 1999). El objetivo del presente trabajo fue determinar la existencia de receptores de 5-HT en el testículo de esta especie. Para ello, se aislaron células de Leydig a partir de hámsteres adultos mantenidos en fotoperíodo normal, y se realizaron experimentos de producción *in vitro* de T en presencia o ausencia de hCG y agonistas (Ag.) /antagonistas (Ant.) de receptores de 5-HT. **Resultados:** Efecto de Ag. sobre la producción de T (ng/10⁶ células) en presencia de 100 mUI/ml de hCG: Control $28,1 \pm 2,5$ vs: a) 10⁻⁶M de 8-OH DPAT (Ag. 1A) $19,7 \pm 2,2$ ($p < 0,05$); b) 10⁻⁶M de Oxymetazoline (Ag. 1A/B/C/D) $20,0 \pm 2,6$ ($p < 0,05$); c) 10⁻⁶M de DOI (Ag. 1C/2) $17,3 \pm 1,3$ ($p < 0,05$); d) 10⁻⁶M de Quipazina (Ag. 2/3) $19,3 \pm 1,5$ ($p < 0,05$). Efecto de Ant. sobre la producción de T (ng/10⁶ células) en presencia de 100mUI/ml de hCG: Control $26,9 \pm 0,5$ vs: a) 10⁻⁶M de 5-HT $20,5 \pm 1,2$ ($p < 0,05$); b) 10⁻⁶M de 5-HT + 10⁻⁶M de Ketanserina (Ant. 1C/2) $25,8 \pm 1,6$; c) 10⁻⁶M de 5-HT + 10⁻⁶M de Metoclopramida (Ant. 3) $20,1 \pm 0,9$ ($p < 0,05$). Los resultados expuestos describen de manera original, la existencia de receptores de 5-HT tipo 1 y tipo 2 en células de Leydig del hámster, y la ausencia de receptores de 5-HT tipo 3.

159. Rol de Serotonina y Melatonina en la producción testicular de Testosterona en el hámster: Factor liberador de corticotrofina, un intermediario clave en dicha acción. Mónica Frungieri^{1,2}, Karina Zitta¹, Omar Pignataro¹, Silvia Gonzalez-Calvar^{1,2}, Ricardo Calandra^{1,3}

¹ Instituto de Biología y Medicina Experimental-Conicet; ² Cátedra Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; ³ Cátedra de Endocrinología, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata

Recientemente hemos descrito la presencia de serotonina (5-HT) en el testículo del hámster, y su efecto inhibitorio sobre la esteroidogénesis que modula selectivamente la producción de diferentes andrógenos según el estado funcional de la gónada (Frungieri y col, SAEM, 1997; Frungieri y col, Neuroendocrinol 69:299, 1999). El objetivo del presente trabajo fue profundizar en el estudio del mecanismo de acción de la 5-HT sobre la síntesis de andrógenos testiculares, y evaluar la participación de su metabolito: la Melatonina (Mel), en dicho proceso. Para ello, se aislaron células de Leydig a partir de hámsteres adultos mantenidos en fotoperíodo normal, y se realizaron experimentos de producción *in vitro* de testosterona (T) en presencia o ausencia de hCG, 5-HT, Mel, factor liberador de corticotrofina (CRF) y un antagonista (Ant.) de CRF. **Resultados:** Producción de T (ng/10⁶ células) en presencia de 100 mUI/ml de hCG: Control $10,1 \pm 0,3$ vs: a) 10⁻⁶M de CRF $8,2 \pm 0,3$ ($p < 0,05$); b) 10⁻⁶M de 5-HT $8,8 \pm 0,6$ ($p < 0,05$); c) 10⁻⁶M de Mel $8,3 \pm 0,6$ ($p < 0,05$); d) 10⁻⁶M del Ant. de CRF $12,9 \pm 0,6$ ($p < 0,05$); e) 10⁻⁶M de CRF + 10⁻⁶M del Ant. de CRF $10,7 \pm 0,4$; f) 10⁻⁶M de 5-HT + 10⁻⁶M del Ant. de CRF $10,2 \pm 0,7$; g) 10⁻⁶M de Mel + 10⁻⁶M del Ant. de CRF $10,3 \pm 0,8$. Los pre-

sentes resultados indican que 5-HT y Mel modulan negativamente la producción testicular de T en el hámster, siendo el CRF un intermediario en dicha acción.

160. Efectos de distintos ácidos grasos (AG) saturados e insaturados y de prostaglandinas (PG), en comparación con el ácido araquidónico (AA), sobre la esteroidogénesis en células de Leydig MA-10. Carolina Mondillo, Cecilia Reche, Zoraida Patrignani, Omar Pignataro

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

Habíamos mostrado previamente en esta Sociedad que el AA estimulaba la síntesis de esteroides en células MA-10. En este trabajo, se estudió el efecto de otros AG: saturados, mono y poliinsaturados (AGP) y de prostaglandinas (PG), en comparación con AA, sobre la producción de progesterona (Pg), en ausencia o presencia de EGF (5 ng/ml) o de dbAMPc (0,1 mM). Se estudiaron los siguientes AG (175 μ M): C18:0; C18:1, ω 9; C20:0; C20:1, ω 9; C20:2, ω 3; C20:3, ω 3; C20:3, ω 6; C20:4, ω 6 (AA); C20:5, ω 3 y PG (10^{-8} - 10^{-6} M): E₂ y F_{2a}. **Resultados:** (en ng Pg/10⁶ cél x 6 h): C: 0.6 ± 0.1 ; AA: 16.0 ± 2.4 ; EGF: 2.9 ± 0.1 ; dbAMPc: 66 ± 5 ; AA+EGF: 598 ± 35 ; AA+dbAMPc: 2336 ± 176 . Los AG saturados, los ω 9 mono insaturados y las PG no mostraron diferencias respecto a los controles. Los ω 3 AG mostraron una respuesta aumentada, pero de menor magnitud que con AA, sólo en presencia de dbAMPc pero no con EGF. En cambio, el C20:3, ω 6, aumentó, a valores comparables con el AA, tanto la síntesis de Pg basal como en presencia de EGF y dbAMPc. **Conclusiones:** 1-En las células de Leydig MA-10, los AG ω 6, C20:3 y C20:4 (AA), estimulan la síntesis de Pg en forma similar. 2-En concordancia con datos previos, el EGF activa la esteroidogénesis por un mecanismo diferente al de hCG. (Subsidios: PIP/98-CONICET y PICT/97-ANPCYT).

161. Preponderancia de isoformas básicas de LH en adolescentes con poliquistosis ovarica. Cecilia García Rudaz¹, Gabriela Ropelato¹, Cecilia Castro-Fernandez², Alfredo Ulloa-Aguirre², María Eugenia Escobar¹, Johannes Velhuis³, Marta Barontini¹

¹ Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Buenos Aires, Argentina. ² Instituto Nacional de la Nutrición, México.

³ Department of Internal Medicine, University of Virginia, Virginia, USA.

Hemos descrito un aumento en la frecuencia de pulsos de LH y de la masa de LH secretada por pulso en PCO. Para dilucidar que factores determinan estas alteraciones se estudiaron 12 adolescentes con PCO y 10 controles eumenorreicas en quienes se realizó secreción espontánea de 12 horas nocturnas (muestras cada 20 minutos). En un pool de las muestras de suero de cada paciente y de cada control se determinó la inmunoreactividad de LH por IFMA y la bioactividad por bioensayo en células de Leydig de rata. Para evaluar la distribución de las isoformas de LH se utilizó isocromatografía y las muestras fueron nuevamente combinadas obteniéndose 3 pools de suero de pacientes y 3 de controles. En las pacientes con PCO la concentración sérica de LH inmunoreactiva y bioactiva fue 3 y 2 veces respectivamente mayor que en los controles (PCO: 7.8 ± 0.9 ; C: 2.6 ± 0.3 UI/l, $p < 0.001$), (PCO: 52 ± 10 ; C: 25 ± 4.1 IU/l, $p = 0.002$). La relación bio/inmuno LH en el grupo PCO, estuvo en consecuencia significativamente disminuida comparada con los controles ($p < 0.05$). En el grupo PCO, la LH bioactiva correlacionó positiva y significativamente con los niveles de 17-OHP₄ ($p = 0.022$), A ($p = 0.012$) y T ($p = 0.046$). En el grupo PCO, la separación por cromatografía mostró una mayor inmunoreactividad de LH a pH > 8 y entre 7.99-7.0, comparada con los controles ($p = 0.031$). Las isoformas básicas de LH mostraron una correlación positiva y significativa con las concentraciones de 17-OHP₄ ($p = 0.032$), A ($p = 0.046$) y T ($p = 0.040$). La preponderancia de isoformas básicas, de vida media corta en plasma, en las pacientes con PCO sugeriría una hipersecreción basal (no pulsátil) de LH en este grupo de pacientes.

162. Inhibinas: posibles marcadores de la función de la célula de Sertoli en niños y adolescentes con varicocele. Romina Trigo, María Gabriela Ballerini, Silvia Gottlieb, N.P.Groome, I. Bergadá, C. Bergadá, Stella Campo

CEDIE, Hospital de Niños R. Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina; Oxford Brookes University, Oxford, Inglaterra.

Las inhibinas son glicoproteínas producidas, principalmente, por las gonadas. Su principal acción biológica es suprimir la síntesis y secreción de FSH. La inhibina B ha sido propuesta como marcador de la función de la célula de Sertoli y de la espermatogénesis en el adulto. El objetivo de este trabajo fue determinar las posibles alteraciones en el perfil de inhibinas séricas (inhibina B, Inh B y precursor de subunidad α , Pro- α C) en niños prepúberes (Tanner I) y púberes (Tanner II a V) con varicocele. Se estudiaron 7 pacientes prepúberes (edad: 10-13, VT₁) y 52 púberes (edad: 12-20, VT_{IIa} y VT_{IIb}). Los grupos controles fueron 7 varones prepúberes (edad: 10-12, CT₁) y 7 varones púberes (edad: 12-19, CT_{IIa} y CT_{IIb}). Se determinaron los niveles de FSH y LH por IFMA; T por RIA y las inhibinas por un ensayo inmunoenzimático de dos sitios. Los niveles de FSH, LH y T en VT₁ y en V T_{IIa} y V T_{IIb} fueron similares a los grupos control. En VT₁ los niveles de Inh B y Pro- α C se encontraron aumentados respecto del control: 287.3 ± 13.9 vs 179 ± 36.8 , $p < 0.05$ y 591.8 ± 106.6 vs 99.3 ± 24.6 , $p < 0.001$. En VT_{IIa} se observó Inh B similar al control y Pro- α C aumentada (312 ± 14.7 vs 400 ± 63.6 y 589 ± 65.9 vs 310 ± 93 , $p < 0.05$). La alteración observada en los niveles circulantes de inhibinas en niños prepúberes con varicocele, asociados a niveles normales de gonadotropinas, podría ser secundaria a una modificación en la bioactividad y/o pulsatilidad de las gonadotropinas o deberse a una maduración temprana, independiente del estímulo gonadotrófico, de la célula de Sertoli.

163. Polimorfismo de FSH en varones en pubertad media con varicocele. Acción del GnRH. Verónica Zaldivar, Verónica Ambao, Silvia Gottlieb, Silvina Creus, Stella Campo.

CEDIE, Hospital de Niños R. Gutiérrez, Buenos Aires.

En la pubertad media la FSH circulante presenta características específicas para este estadio del desarrollo puberal: bajo contenido de ácido siálico y predominio de isoformas circulantes con oligosacáridos de tipo híbrido (Medicina 56(5/2); Abs132, 1996). Un estímulo agudo con GnRH libera hormona menos sialilada y no modifica el perfil de distribución de isoformas aislado de acuerdo a la estructura interna de la cadena carbohidratada. El objetivo de este trabajo fue determinar el polimorfismo de la FSH sérica en condiciones basales y luego de un estímulo con 50 μ g de GnRH en pacientes en pubertad media, con varicocele e hiperrespuesta de LH al estímulo con GnRH. La distribución de análogos de carga se determinó por isoelectroenfoque preparativo y las isoformas de acuerdo a la estructura de la cadena interna de carbohidratos por cromatografía en Concanavalina-A se determinó en dos muestras combinadas de 4 pacientes cada una. En condiciones basales más del 50% de la FSH enfocó entre pH: 2.5 y 4.0 (control, 26%). No se observó FSH a pH > 5.0 (control: 12,5%) El GnRH no provocó la aparición de análogos de carga entre pH 5.0 y 6.0 (control: 51%). La distribución de isoformas de FSH de acuerdo a la estructura interna de la cadena carbohidratada no presentó cambios respecto al control, tanto en condiciones basales como luego del GnRH. Estos resultados muestran que los pacientes estudiados presentan una FSH circulante en la pubertad media con un mayor contenido de ácido siálico que no puede ser modificado por la acción del GnRH. Se desconoce el posible efecto biológico a nivel del tejido blanco, que podría tener un aumento del tiempo de permanencia en circulación de FSH, en esta etapa del desarrollo puberal del varón.

164. Polimorfismo de FSH en ausencia de gonada masculina. Acción del GnRH. Verónica Ambao, Verónica Zaldivar, Gabriela Fernandez Vera, Silvia Gottlieb, Silvina Creus, Stella Campo

CEDIE, Hospital de Niños R. Gutiérrez, Buenos Aires.

En niños prepuberales normales la FSH circulante se caracteriza por su alto contenido de ácido siálico y el predominio de isoformas con oligosacáridos biantenarios/truncados y de tipo híbrido (Medicina 56(5/2); Abs132,1996). Un estímulo agudo con GnRH libera hormona menos sialilada y aumenta la proporción de isoformas circulantes con cadenas carbohidratadas de alto grado de ramificación (Medicina 58(5/2); Abs 25,1998). El objetivo de este trabajo fue determinar el polimorfismo de la FSH sérica en condiciones basales ($n=7$) y luego de un estímulo con 25 μg de GnRH ($n=4$) en niños anóquidos (15 meses-12 años). La distribución de análogos de carga se determinó por isoelectrofoque preparativo y las isoformas de acuerdo a la estructura de la cadena interna de carbohidratos por cromatografía en Concanavalina-A. En condiciones basales la FSH enfocó entre pH: 2.5 y 5.5 (control, pH: 3.0-5.0). El GnRH provocó la aparición de análogos de carga más ácidos pH: 2.0-5.5 (control, pH: 3.5-5.5). La distribución de isoformas de FSH mostró el predominio de isoformas con oligosacáridos complejos (triantenarios/bisectados, $33 \pm 11\%$, y biantenarios/truncados, $45 \pm 11\%$), sin observarse cambios por acción del GnRH. Estos resultados muestran que en ausencia de gonada el polimorfismo de FSH tiene características diferentes al observado en condiciones fisiológicas, tanto en el contenido de ácido siálico como en la proporción de isoformas con oligosacáridos de alto grado de ramificación. El control hormonal de la actividad de la sialiltransferasa hipofisaria por GnRH requeriría la presencia de gonadas en etapas tempranas de la vida.

INFECIOSAS

- 165. Búsqueda de marcadores de virulencia en cepas del virus de la coriomeningitis linfocitaria.** Carmen Saavedra, Ana Ambrosio, Laura Riera, Josefa Sottosanti, Marta Sabattini

Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio Maiztegui" Pergamino.

El vLCM es el prototipo de la Familia renaviridae y fue el primer miembro de este grupo reconocido como patógeno para humanos. Su área endémica en Argentina se encuentra al menos parcialmente superpuesta con la del virus Junin. Esta situación de coexistencia y la demostración de variantes de diferente virulencia para los arnavirus Junin, LCM y Lassa, permite esperar la existencia en Argentina de cepas de vLCM de diferente características y en este trabajo se buscaron marcadores para distinguir virulencia. Se estudió la eficiencia de infección letal para ratón albino de las cepas de vLCM 13065, 7134, 4949 (origen ratón), de 5226, 8573 (origen humano), y cepas prototipo WE Armstrong del vLCM. Cada cepa se obtuvo de cerebro de ratón recién nacido (suspensión al 20%). Se inocularon diferentes diluciones de cada cepa en ratones albinos suiss (N:NIH) recién nacidos (24-48 hs) y adultos (25-30 días). Las 7 cepas ensayadas (100%) resultaron letales para ratón adulto, con títulos desde $10^{4.69}$ a $10^{7.33}$ DL50/ml. En contraste, solo 1/7 cepas (14,2%), la Cba 13065 resultó letal para ratón recién nacido, con título de $10^{7.68}$ DL50/ml. Estas diferencias señalan: a) que existen en Argentina cepas de vLCM con distintas características, b) al ratón albino lactante como un huésped adecuado para diferenciar cepas de vLCM, debiéndose buscar correlaciones a nivel molecular profundizar las eventuales relaciones de estos hallazgos con patogenicidad para humanos.

- 166. Variabilidad genética del Virus Junin.** Jorge García, Sergey Morzunov, Silvana Levis, Joan Rowe, Gladys Calderón, Delia Enría, Marta Sabattini, Michael Buchmaier, Michael Bowen y Steve StJeor

Instituto Maiztegui, ANLIS, Pergamino, Universidad de Nevada, Reno, Scripps Research Institute, La Jolla y Center for Disease Control, Atlanta USA.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la variabilidad genética del virus Junin (JUN), su distribución geográfica y tem-

poral, y su posible relación con el cuadro clínico de fiebre hemorrágica argentina (FHA). Para ello se purificó el RNA de 42 cepas de JUN: 27 de pacientes que padecieron FHA, 13 aisladas de roedores capturados en el área endémica de la enfermedad y las cepas de laboratorio XJC13 y XJ44, derivadas de la cepa prototipo XJ. Las cepas fueron aisladas en ratón lactante o en cultivo de células Vero. Se amplificaron dos fragmentos de 511 y 495 nucleótidos correspondientes al gen de la nucleocápside (N) y de la glicoproteína de envoltura viral (GPC). Se realizó el análisis filogenético empleando el método de la máxima parsimonia y de neighbor-joining. Las cepas presentaron una identidad mayor al 87% a nivel nucleotídico (nt) y mayor al 91% a nivel aminoacídico (aa) para GPC y superior al 91(nt) y 96% (aa) para N. El análisis filogenético de ambos genes reveló la existencia de 3 agrupamientos: uno que comprende 4 cepas aisladas en la provincia de Córdoba (años 1963-71), otro que comprende 4 cepas aisladas en las cercanías de Zárate (1993-4) y un tercero que comprende el resto de las cepas provenientes de toda el área endémica (1973-98). De 7 cepas de este último grupo se secuenció un fragmento de 803 nucleótidos del GPC, no pudiendo atribuirse ninguna sustitución de aminoácido a severidad o forma clínica de la enfermedad.

- 167. Evolución de la función pulmonar en sobrevivientes a síndrome pulmonar por hantavirus.** Ana Diez[#], Ana Briggiler*, María Rondelli[#], Eleonora Crivelli*, Noemí Pinti*, Juan Figueroa Casas[#], Delia Enría*

*# Instituto Cardiovascular de Rosario - *Instituto Maiztegui, Pergamino.*

Al presente se diagnosticaron alrededor de 500 casos de Síndrome Pulmonar por Hantavirus (SPH) en las Américas, de los cuales 250 corresponden a nuestro país. El objetivo del presente trabajo es evaluar la función pulmonar de pacientes con SPH, buscando evidencias de secuelas pulmonares a largo plazo. Entre abril 1998 y agosto 1999 se estudió la función pulmonar de 9 pacientes con SPH, confirmados mediante demostración de anticuerpos IgM e IgG por técnica de ELISA y/o PCR positivo. En todos los participantes se realizó radiografía de tórax, gases en sangre, espirometría, medición de difusión de monóxido de carbono (Dlco) y evaluación del intercambio gaseoso (índice de oxigenación $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ [(Pa/Fi) O_2]), durante el período agudo y la convalecencia de la enfermedad. Al alta de internación se observó CVF normal con disminución moderada de Dlco ($\bar{x} = 67\% \pm 22$) y de PaFiO_2 ($\bar{x} = 363 \pm 37 \text{ mmHg}$). Estos valores mejoraron entre 60 y 180 días, observándose Dlco ($\bar{x} = 89\% \pm 8.7$) y PaFiO_2 ($\bar{x} = 441 \pm 50$). Este estudio muestra evidencias de disfunción pulmonar en etapa aguda, caracterizada por CVF normal con moderada disminución de la Dlco y leve trastorno del intercambio gaseoso. Estas alteraciones revirtieron entre 60 y 180 días, excepto en un paciente, a diferencia de los hallazgos de otros investigadores que aún las encuentran al año de la enfermedad.

- 168. Estudio del fibrinógeno como factor de riesgo en la enfermedad de Chagas.** Mónica Fantino, Clara Tulián, Ruth Fernández, Julio Enders, Walter Rivarola, Patricia Paglini

Cátedra de Física Biomédica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

El fibrinógeno representa un factor de riesgo para las cardiopatías isquémicas y está asociado a procesos inflamatorios e infecciosos con desequilibrio en la generación de trombina y del coágulo de fibrina. En la Enfermedad de Chagas el endotelio se ve tempranamente comprometido durante el curso de la infección. Este trabajo propone estudiar si el número de parásitos o la evolución de la enfermedad, modifican los niveles de fibrinógeno plasmático (FP) y relacionar los cambios con las lesiones anatomopatológicas. Se utilizaron ratones albinos suizos infectados con tripomastigotes, estudiados en la etapa aguda (con alta y baja parasitemia), indeterminada y crónica de la enfermedad. Los valores de FP (en mg/dl) fueron superiores en el grupo agudo con alta parasitemia (a.p.) ($498,3 \pm 35,7$) ($p < 0,01$) y en el indeterminado ($437,4 \pm 35,2$) ($p < 0,01$)

con respecto al grupo control ($289,2 \pm 7$), al agudo con baja parasitemia ($311,6 \pm 11,7$) y al crónico ($333,2 \pm 16,4$). El grupo agudo a.p. y el indeterminado mostraron lesiones con intenso infiltrados inflamatorios, las cuales se ven disminuidas en el resto de los grupos. Se puede concluir que el incremento en el FP está asociado a la presencia de importantes lesiones endoteliales como ocurre en la etapa aguda a.p., y en la etapa indeterminada. Por lo tanto la concentración elevada de FP representa un factor de riesgo para la cardiopatía chagásica.

169. Efectos de la hemorragia sobre la frecuencia cardíaca en ratas infectadas con *Trypanosoma cruzi*. Héctor Berra, Javier Herrera, Stella Pezzotto, Darío Galmarini, Silvia Revelli

Cátedras de Fisiología, Farmacología e Instituto de Inmunología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario.

Las variaciones de la frecuencia cardíaca (FC) que siguen a la pérdida de volumen sanguíneo pueden utilizarse para monitorear el estado de los mecanismos de regulación cardiovascular. A 8 ratas "I" testigos (T1 y T2) y 8 ratas infectadas al destete (I1 e I2) con 106 tripomastigotes de la cepa Tulahuén, se les cateterizó la arteria femoral a los 20 días post-infección (peso: $x \pm DS = 200 \pm 15$ g), dejándose fluir la sangre a un reservorio a 55 cm de altura y extrayendo: $x: 4,5$ ml/hora ($n=16$), sin reposición ulterior. El procedimiento se comenzó a partir de los 30' (grupos T1 e I1) y de los 90' (T2 e I2) post-anestesia con 50 mg/kg peso de pentobarbital sódico, midiéndose FC por electrocardiografía cada 5' de 0 a 60. Además, a 11 testigos (Ta) y 9 infectadas (Ia) se las anestesió de igual forma y se midió FC basal (B) y a los 10', 30' y 60' sin hemorragia. A los 60' la FC de la fue significativamente menor que la de Ta (U-test, $p<0.05$) y que B (Wilcoxon, $p<0.05$). La FC no difirió entre T1 e I1 a lo largo de todo el experimento, mientras que para T2 (x min: 423, max: 505) fue mayor que para I2 (x min: 230, max: 335) en todos los intervalos medidos (pruebas U, $p<0.05$). Los resultados sugerirían una respuesta deprimida de la FC frente al trauma quirúrgico y la hemorragia en ratas infectadas con *Trypanosoma cruzi*.

170. Variación de la capacidad antioxidante total en el humor vítreo de pacientes con Toxoplasmosis. Sandra Ferreira, Alejandro Berra, Rosario Díaz, Susana Llesuy

Cátedra de Química General e Inorgánica. Departamento de Química Analítica y Fisicoquímica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

Los ojos humanos al igual que los de otros animales diurnos están expuestos a la radiación más que cualquier otro órgano del cuerpo. El estrés oxidativo y los sistemas antioxidantes son importantes para los tejidos oculares desde que se ha sugerido que el daño ocasionado por la radiación UV, involucra a las especies reactivas del oxígeno. El humor vítreo es el sitio final de protección para la retina contra la radiación, allí los antioxidantes hidrosolubles deben interactuar con los radicales libres; esto implica que un desbalance en la protección antioxidante podría alterar el metabolismo normal de la retina y el cristalino. El objetivo de este trabajo fue evaluar y comparar la capacidad antioxidante total (TRAP) del humor vítreo de 26 humanos controles contra 3 pacientes infectados con *Toxoplasma gondii*. La capacidad antioxidante total fue medida según la técnica descrita por Lissi et al (Free Rad Biol Med 18 153-8; 1995). Los valores de TRAP del ojo derecho e izquierdo no mostraron tener diferencias significativas. El valor de TRAP de pacientes infectados fue 24 ± 2 μ M Trolox/mg de proteína ($p < 0.001$) y el valor control de TRAP 112 ± 9 μ M Trolox/mg de proteína. El presente estudio sugiere que el TRAP puede medirse en el vítreo y que el mismo disminuye en los pacientes infectados. El resultado obtenido sugiere que el humor vítreo posee una importante capacidad atrapadora de radicales libres y actividad antioxidante. Un objetivo futuro será evaluar en modelos animales o humanos el contenido de antioxidantes en el humor vítreo asociado con distintas patologías oculares y con la edad.

171. Patogénesis de la infección genital por virus Herpes simplex-2 en ratonas preñadas. Norberto Sanjuan y María Noel Zimberlin

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

El objetivo fue estudiar la progresión de la infección genital por virus Herpes simplex-2 (HSV-2) durante la preñez. 26 ratonas Balb/c fueron infectadas por vía intravaginal con 5×10^5 upf de HSV-2, 18 entre 10 y 14 días de preñez, y 8 a los 3 días de preñez. Otras 10 ratonas preñadas fueron inoculadas con medio sin virus. Los animales fueron sacrificados al encontrarse moribundos, y la presencia de HSV-2 se determinó por inmunoperoxidasa en cortes de tejidos, por microscopía electrónica, y por detección de viremia. 17/26 ratonas (65,38%) presentaron signos de infección genital y murieron entre 7-9 días pi. Las 8 ratonas infectadas a los 3 días de preñez y 4/18 infectadas entre los 10-14 días de preñez presentaron abortos múltiples (70,58% de las infectadas). Las restantes 5 infectadas que tuvieron fetos a término presentaron distocias severas en el trabajo de parto. Ninguna de las ratonas no infectadas tuvo abortos o distocias. Se detectó HSV-2 en células del miometrio, nervios y ganglios del sistema nervioso autónomo incluyendo los plexos mientéricos, fibras que inervan arteriolas, y médula espinal. No se encontró HSV-2 en los abortos ni en las placentas, y tampoco se detectó viremia. Se concluye que la alta incidencia de abortos no es producida por el pasaje materno fetal de HSV-2, sino, probablemente, por la infección de fibras del sistema nervioso autónomo que inervan a las arteriolas que nutren al útero. El mismo compromiso de las fibras autonómicas determinaría la hipodinamia uterina durante el trabajo de parto.

172. Migración intracelular del virus Polioma. Norberto Sanjuan, Analía Porrás, Javier Otero

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

El objetivo de este trabajo fue caracterizar los compartimientos intracelulares involucrados en la replicación y en la migración de Polioma, un virus que puede replicar y producir neoplasias en ratones. Se infectaron cultivos de células BMK, y NIH 3T3 con una M.O.I de 1 upf/célula de la cepa de Polioma PTA. Se tomaron muestras por duplicado a las 2, 12, 18, 24 y 48 hs post-infección (pi), que fueron estudiadas con inmunofluorescencia indirecta doble contra Tubulina y contra la proteína mayor de la cápside viral, VP-1, o procesadas para microscopía electrónica de transmisión. A partir de las 12 hs pi se observaron cuerpos de inclusión redondeados, positivos para VP-1, ubicados en el citoplasma de ambos tipos de células. A las 18 hs pi estos cuerpos eran perinucleares, y a las 24 hs los núcleos celulares eran homogéneamente positivos para VP-1. Ultraestructuralmente los cuerpos de inclusión eran vesículas rodeadas de una membrana, conteniendo partículas virales completas, aún antes de detectar virus en el núcleo a partir de las 24 hs pi. A las 48 hs pi las células estaban repletas de virus ubicados en el núcleo, formando agregados pseudocristalinos en el citoplasma, adheridos a los microtúbulos, y linealmente asociados a todas las membranas biológicas, especialmente la plasmática. No se observaron imágenes de estallido celular ni liberación de partículas virales al medio intercelular. Se concluye que Polioma replica formando viroplasmias, que migra asociado a microtúbulos, y que no es liberado por estallido celular, sino adherido a membranas biológicas.

173. Síntesis de VP-1 y ausencia concomitante de encapsulación, en macrófagos infectados con virus Polioma. Norberto Sanjuan, Ana Cagnoni, Vanina Kanoore-Edul

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

El objetivo de este trabajo fue estudiar la relación entre la expresión de la proteína mayor de la cápside de Polioma (VP-1) y la producción de viriones infectantes en macrófagos. Se reali-

zaron cultivos primarios de macrófagos peritoneales de ratones neonatos y adultos de la cepa C3H BiDa, y macrófagos de la línea continua ATCC J-774 con medio DMEM y 10% de suero fetal bovino. Los cultivos fueron adsorbidos 2 hs con la cepa PTA de Polioma, con una M.O.I. de 10 ufp/célula. A las 2, 24 y 48 hs post-infección (pi), VP-1 fue detectada por inmunofluorescencia indirecta (IFI). En los mismos tiempos pi se procesaron muestras para microscopía electrónica de transmisión. Como controles se utilizaron células no infectadas. Mediante IFI se observó un incremento en la síntesis de VP-1 en todos los cultivos infectados, a medida que aumentó el tiempo pi. La localización de VP-1 fue exclusivamente citoplasmática (a diferencia de lo que ocurre en otras células murinas), y contenida en cuerpos redondeados perinucleares que, ultraestructuralmente, eran vesículas rodeadas de una unidad de membrana, con contenido fibrilar electrón-denso. En ningún caso se detectaron partículas virales maduras en el núcleo o en el citoplasma. Se concluye que la síntesis de VP-1, a diferencia de lo aceptado hasta hoy, no necesariamente va acompañada de ensamblaje viral, y que la acumulación citoplásmica de esta proteína de la cápside ocurre dentro de estructuras distintas al retículo endoplásmico rugoso, hecho novedoso en el ciclo de replicación de un virus sin envoltura.

174. Actividad antiherpética in vitro de polisacáridos sulfatados extraídos del alga *Bostrychia montagnei*. Diego Nosedá, Miguel Nosedá, Siumara Tulio, María Duarte, Carlos Pujol, Elsa Damonte

Laboratorio de Virología. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. U.B.A. y Depto. de Bioquímica. Universidad Federal de Paraná. Brasil.

En la búsqueda de nuevas sustancias antivirales de origen natural, se estudió la actividad antiherpética de galactanos sulfatados presentes en la pared celular del alga roja *Bostrychia montagnei*. Del fraccionamiento en una columna de DEAE Sephadex A-50 la fracción eluida con NaCl 1,5 M (Bm) fue la que mostró mayor actividad antiviral. También resultó activo un extracto crudo obtenido con agua a 65 °C (HW). Para determinar la concentración inhibitoria 50% (CI50) contra herpes simplex virus tipos 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2) y las mutantes de HSV-1 deficientes en timidina quinasa B2006 y Field, se empleó un ensayo de reducción del número de placas en células Vero. La CI50 de Bm fue de 15,4; 12,4; 4,1 y 5,8 µg/ml, mientras que la CI50 de HW fue de 20,5; 20,7; 1,5 y 3,3 µg/ml para HSV-1, HSV-2, B2006 y Field, respectivamente. La concentración citotóxica 50% (CC50) obtenida por el método de MTT en células Vero, fue de 730 µg/ml para ambas fracciones, muy superior a la CI50, dando elevados índices de selectividad. En ensayos de actividad virucida no se observó efecto de los polisacáridos sobre la replicación viral. Al estudiar el mecanismo de acción, se vio que ambas fracciones actuaban sobre la etapa de adsorción del virus a las células, ya que agregadas con posterioridad a la misma no eran activas. Los resultados obtenidos remarcan la particular trascendencia que pueden tener las sustancias naturales en la terapia antiviral.

NEUROCIENCIAS A

175. Receptores para benzodiazepinas (R-BZ) en la medula espinal lumbar de ratas macho: efecto de gonadectomía (GDX) y tratamiento con propionato de testosterona (TP). Verónica Dorfman, Cristina Vega, Héctor Coirini

Laboratorio de Neurobiología, IBYME, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

La regulación por andrógenos testiculares de los R-BZ fue evaluada en la región lumbar 5-6, donde se localizan los núcleos motores involucrados en erección peneana, eyaculación y reflejos ex-cópula. Animales adultos (45 días) fueron GDX bajo anestesia y 3 días después, infectados con TP (400µg/kg disuelto en aceite vegetal; n=5) en forma subcutánea durante 7 días a las

18:00. Los animales fueron sacrificados por decapitación 18 a 20 horas luego de la última inyección junto con animales intactos (SHAM, n=5) y animales GDX (n=5) en los que se empleó aceite vegetal como vehículo. Secciones coronales de la médula lumbar, procesadas para autorradiografía cuantitativa, fueron incubadas a 40°C con [³H]-flunitrazepan (10nM; [³H]-FLU) en ausencia o presencia de diazepam 500X (unión no específica). Luego de 15 días de exposición los film fueron revelados y cuantificados mediante un sistema computarizado (Macintosh-NIH-Image). Los valores de unión específica del ligando en las láminas II-III de ratas SHAM fueron de 205,1 ± 3,3 fmoles/mg de tejido húmedo, observándose una disminución significativa (p<0.005; ANOVA/test Fisher) en la unión de [³H]-FLU en médula de ratas GDX + TP : 192,2 ± 5,6 fmoles/mg. La GDX no produjo cambios significativos respecto de animales SHAM. El estudio morfológico de los núcleos motores no indicó cambios en la frecuencia de distribución de tamaño de las motoneuronas presentes en los tres grupos. La reducción en la densidad de R-BZ por TP podría deberse en parte a la acción de estrógenos producidos a partir de testosterona por la aromatasa, cuya actividad ha sido directamente implicada con un normal crecimiento del árbol dendrítico de las motoneuronas sexualmente dimórficas. (Subsidiado por PIP 0819/98-CONICET y TM-12-UBA).

176. Expresión astrogliar en corteza frontal de ratas criadas en ambientes diferenciados: efectos de la sustracción de GFAP-IR asociada a vasos. David Gutnisky, Silvina Gayol, Sebastián Lipina, Jorge Colombo

Programa Unidad de Neurobiología Aplicada (PRUNA) (CEMIC-CONICET), Buenos Aires.

La expresión cortical de la proteína glio fibrilar ácida inmunoreactiva (GFAP-IR) de ratas sometidas a ambientes enriquecidos aumenta en comparación con ratas sometidas a privación. Continuando tales estudios, con el objeto de analizar si dicha expresión se correlaciona con la astrogliar asociada a vasos se sometieron ratas impúberes a condiciones de enriquecimiento (Grupo A, N=4) y privación (Grupo B, N=4) ambientales. A los 60 días se procesaron los cerebros para inmunomarcación de GFAP y se obtuvieron muestras corticales (Fr1-3, Zilles 1985) a 1, 3 y 5 mm del polo frontal. Por medio de un sistema semi-automático (Optimas Bioscan) se cuantificó la expresión de GFAP-IR discriminada en forma laminar con y sin la GFAP-IR asociada a vasos. Los datos obtenidos fueron transformados trigonométricamente y analizados el test de Análisis de Varianza Múltiple. Se encontraron diferencias significativas en la expresión de GFAP-IR al analizar: **A)** cada grupo por separado con y sin vasos (*Grupo A*: p<0.05, F=521,88; *Grupo B*: p<0.05, F=341,71); y **B)** grupos con respecto a **tratamiento** (*A vs B con vasos*: p<0.0001, F=544,92; *A vs B sin vasos*: p<0.0001, F=438,29), **láminas** (*A vs B con vasos*: p<0.0001, F=187,74; *A vs B sin vasos*: p<0.0001, F=251,91) y **segmentos** (*A vs B sin vasos*: p<0.0001, F=26,78). Las diferencias entre grupos en la expresión de GFAP-IR no varió al excluir los procesos inmunoreactivos asociados a vasos, lo cual sugiere que las diferencias observadas estarían asociadas al efecto ambiental sobre la expresión de la GFAP-IR en el neuropilo. Agrad.: Fundación Conectar, CEMIC, CONICET.

177. Receptores dopaminérgicos hipocámpales en la exploración de ambientes conflictivos en la rata. Sergio Salas, Edgardo Alvarez

Unidad de Farmacología del Comportamiento. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza.

Evidencias previas de nuestro laboratorio han mostrado que el hipocampo regula la conducta exploratoria. El objetivo del presente trabajo fue evaluar si la actividad dopaminérgica del hipocampo influencia la exploración conflictiva en la rata. Se implantaron animales con cánulas de microinyección en el hipocampo ventral. Tres días después los animales se microinyectaron con

Salina, y/o Metabisulfito de Sodio (Met), apomorfina (Apm) o R(+)-SCH-23390 (antagonista D₁). Cinco min después, se sometieron a la exploración de un Laberinto en Cruz Elevado Asimétrico (LCEA) por 5 min. Los resultados mostraron que Apm (dosis 1 y 10 nmol, n=12, n=14) aumentó el tiempo de exploración de uno de los brazos considerado "atemorizante" (48.77 ± 7.45 s vs 16.35 ± 7.43 s, $p < 0.05$, Apm 1 nmol vs Met) sin cambios en el tiempo de permanencia. La administración de SCH (n=21) bloqueó totalmente el efecto de Apm (20.19 ± 3.88 s vs 48.77 ± 7.45 s, N.S., SCH vs Apm 1). En uno de los brazos menos atemorizante, Apm (ambas dosis) disminuyó el tiempo de exploración pero que no fue estadísticamente significativo. No obstante, SCH restauró la exploración a los niveles de control (50.23 ± 5.76 s vs 52.92 ± 10.27 s, N.S., SCH vs Met). Los datos obtenidos sugieren que el hipocampo ventral participaría en los procesos de exploración mediante la activación de receptores tipo D₁ en las neuronas dopaminérgicas.

178. Activación de receptores dopaminérgicos hipocampales en la exploración de Ambientes No conflictivos. Sergio Salas, Edgardo Alvarez

Unidad de Farmacología del Comportamiento. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza.

Trabajos previos de nuestro laboratorio, han mostrado que el hipocampo está comprometido en la modulación de la conducta exploratoria en la rata. El objetivo del presente trabajo fue evaluar si la actividad dopaminérgica del hipocampo participa en la exploración no conflictiva de ambientes novedosos. Se implantaron animales con cánulas de microinyección en el hipocampo ventral. Tres días después los animales se microinyectaron 10 y 5 min antes de las mediciones conductuales con Salina, y/o Metabisulfito de Sodio (Met), apomorfina (Apm) o R(+)-SCH-23390 (antagonista D₁). En el tiempo "0", se sometieron a la exploración de un hole-board modificado por 5 min. Los resultados mostraron que Apm (dosis 1 y 10 nmol, n= 12, n=14) no modificó la actividad motora general (2629 ± 238 Cuentas vs 2641 ± 264 Cuentas, Apm 1 nmol vs Met, Actividad Horizontal). Sin embargo, Apm inhibió significativamente la exploración subterránea (5.5 ± 1 veces vs 8.5 ± 1 veces, $p < 0.05$, Apm 1 vs Met) sin cambios en la actividad vertical (3 ± 1 veces vs 4 ± 1 veces, N.S., Apm 1 vs Met) o en la exploración focalizada (38.99 ± 7.73 s vs 18.6 ± 2.85 s, N.S., Apm 1 vs Met). El antagonista SCH (n=21) bloqueó totalmente el efecto de la Apm en la exploración subterránea (9 ± 2 veces vs 5.5 ± 1 veces, $p < 0.05$, SCH vs Apm). Los datos obtenidos sugieren que las neuronas dopaminérgicas del hipocampo ventral participan discretamente en la exploración de ambientes no conflictivos. Aparentemente, esta influencia sería ejercida por la activación de receptores dopaminérgicos tipo 1.

179. Control glutamatérgico hipocampal de la regulación histaminérgica amigdaloides de la memoria. Marcela Ruarte, Edgardo Alvarez

Unidad de Farmacología del Comportamiento. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza.

En el presente trabajo se evaluó si la actividad histaminérgica de la amígdala interactúa funcionalmente con la glutamatérgica del hipocampo en los mecanismos cognitivos de la rata. Se implantaron ratas con cánulas de microinyección en la amígdala y en el hipocampo, sometidos al aprendizaje de una respuesta de evitación condicionada a un tono de ultrasonido. Durante la adquisición, se administraron 9 nmol de histamina (HA) en la amígdala y 10 nmol de AP3 (antagonista metabotrópico) o CNQX (antagonista kaínico) en el hipocampo. Se evaluó el tiempo de latencia de escape (< 30 s, respuesta correcta) y el % de respuestas correctas acumulado. Los resultados mostraron que histamina en la amígdala (n=10) aumenta el tiempo de latencia (25.51 ± 1.35 s vs 8 ± 3.06 s, $p < 0.05$, ensayo 8, Sesión 3, HA vs salina) e inhibe el aprendizaje ($12.5 \pm 3.9\%$ vs $87.5 \pm 2.5\%$,

$p < 0.01$, ensayo 8, Sesión 3). Tanto CNQX (n=9) como AP3 (n=11), ineficaces en bloquear los efectos histaminérgicos en la Sesión 1, en las Sesiones 2 y 3 bloquearon parcialmente el efecto histaminérgico ($50 \pm 6.2\%$ vs $12.5 \pm 3.9\%$, CNQX vs HA; $62.5 \pm 5.3\%$ vs $12.5 \pm 3.9\%$, AP3 vs HA, $p < 0.05$, ensayo 8, Sesión 3). Los resultados plantean una interacción funcional entre amígdala e hipocampo, en donde el ácido glutámico y HA jugarían un papel en los procesos de memoria.

180. Control amigdaloides de la regulación hipocampal de la memoria. Marcela Ruarte, Edgardo Alvarez

Unidad de Farmacología del Comportamiento. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar si la actividad histaminérgica del hipocampo interactúa funcionalmente con la glutamatérgica de la amígdala-baso-lateral en los mecanismos cognitivos de la rata. Se implantaron animales con cánulas de microinyección en la amígdala y en el hipocampo, sometidos al aprendizaje de una respuesta de evitación condicionada a un tono de ultrasonido. Durante la adquisición de la tarea, se administraron 9 nmol de histamina (HA) en el hipocampo y 10 nmol de AP3 (antagonista metabotrópico) o CNQX (antagonista kaínico) en la amígdala. Se evaluó el tiempo de latencia de escape (< 30 s, respuesta correcta) y el % de respuestas correctas acumulado. Los resultados mostraron que HA (n=11) aumenta el tiempo de latencia en las 3 Sesiones (40.0 ± 2.09 s vs 15.24 ± 3.97 s, $p < 0.01$, ensayo 6, Sesión 1, HA vs salina). CNQX en la amígdala (n=10), bloqueó el efecto histaminérgico en todas las Sesiones (26.16 ± 3.62 s vs 40.0 ± 2.09 s, $p < 0.05$, ensayo 6, Sesión 1, CNQX vs HA). En cambio AP3 (n=11) solo fue ineficaz en las Sesiones 1 y 2 (49.31 ± 1.19 s vs 40.0 ± 2.09 s, N.S., ensayo 6, Sesión 1, AP3 vs HA). Resultados semejantes se encontraron con la eficiencia de aprendizaje. Los resultados sugieren la modulación glutamatérgica de la amígdala en los procesos hipocampales de la memoria en la rata.

181. Regiones del lenguaje: correlaciones entre diferencias interhemisféricas de superficies corticales. Alicia Merlo, Eduardo Albanese, Elena Gómez, Jorge Miño, Adriana Ingratta, Tomás Mascitti, Alfonso Albanese

Facultad de Medicina. Universidad del Salvador. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

En estudios previos determinamos la lateralidad del área de Broca (Br) (Arch. Neurol. 46: 307-10; 1989), el planum temporale (PT) y el planum situado caudalmente a éste al que denominamos planum ascendente posterior (PAP). (Rev. Chil. Anat. 16(2): 169-176, 1998). El objetivo fue determinar las correlaciones que se presentan entre las diferencias interhemisféricas de las regiones del lenguaje. Se determinó en 15 cerebros humanos adultos postmortem la superficie cortical de Br, PT y PAP aplicando nuestra metodología (Arch. Neurol. 46: 307-310; 1989) y la suma PT+PAP y Br+PT+PAP (total) y se calculó la diferencia entre la superficie derecha y la izquierda de cada región y del total. Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (r) y su significación estadística entre las diferencias interhemisféricas. El «r» de la diferencia del PT vs la del PAP es de -0.86 ($p < 0.001$) y la del área de Br vs la del total es de 0.98 ($p < 0.001$). El resto de las diferencias interhemisféricas presentó ausencia de correlación. Los resultados favorecen nuestra hipótesis de que el PT y el PAP que tienen lateralidad inversa, presentan complementariedad. La correlación cercana a la unidad entre las diferencias interhemisféricas del área de Br y del total indica una excelente correspondencia. Esta podría alterarse en condiciones patológicas.

182. Regiones limbicas: compensación y asimetría. Alicia Merlo, Eduardo Albanese, Elena Gómez, Jorge Miño, Adriana Ingratta, Tomás Mascitti, Alfonso Albanese

Facultad de Medicina, Universidad del Salvador. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

La compensación es un nuevo concepto relacionado con la lateralidad cerebral que hemos definido y aplicado al gyrus frontalis inferior (24° Congreso Argentino de Neurociencias, 1999). Así como la asimetría está relacionada con el «desequilibrio de dimensión» de una región la compensación (que puede calcularse en regiones bilaterales formadas por dos o más partes) lo está con su «equilibrio». El objetivo fue determinar la compensación a nivel de peso y de superficie cortical en el lóbulo límbico (LL) formado por el gyri cinguli anterior (GCA) y posterior (GCP) y parahipo-campalis (GPH). Se determinó en 20 cerebros humanos adultos postmortem el peso y la superficie cortical del GCA, GCP y GPH aplicando nuestra metodología (Arch.Neurol. 46: 307-310; 1989) A la suma de las diferencias interhemisféricas de cada gyri se la denominó SUM y a la diferencia interhemisférica del LL DIF. Para el LL el % de compensación (COMP%)= (SUM - DIF) x 100 / (valor derecho+valor izquierdo) y el % de asimetría (ASIM%)= (DIF) x 100/ (valor derecho + valor izquierdo). Para peso y superficie las medias \pm ES ($p > 0.05$ ANOVA) de COMP% son (4.20 \pm 0.77 y 4.33 \pm 0.90) y de ASIM% (4.50 \pm 0.73 y 3.07 \pm 0.79). Como pueden ser también determinadas en imágenes, las desviaciones de sus valores podrían contribuir al diagnóstico y al seguimiento.

183. Gyri del lóbulo límbico: peso, superficie y edad. Alicia Merlo, Eduardo Albanese, Elena Gómez, Jorge Miño, Adriana Ingratta, Tomás Mascitti, Alfonso Albanese

Facultad de Medicina, Universidad del Salvador. Facultad de Farmacia y Bioquímica y Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

En trabajos previos hemos demostrado que el gyrus cinguli anterior (GCA), integrante del lóbulo límbico (LL), posee lateralidad derecha (Biol. Psychiatry 38: 13-21; 1995) y su peso derecho disminuye con la edad (SAIC 1994). El objetivo fue determinar si los aportes porcentuales de peso y de superficie cortical expuesta y profunda de los gyri parahipocampalis (GPH), GCA y cinguli posterior (GCP) al LL homolateral sufren variaciones con la edad. Se determinó en 20 cerebros humanos postmortem sin patología (edad media \pm ES: 50.05 \pm 3.84 años; rango 21-87 años) el peso y la superficie cortical del GPH, GCA y GCP de cada hemisferio aplicando nuestra metodología (Arch.Neurol. 46: 307-310; 1989) y por suma el peso y superficie de cada LL (100%). Se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson (r) entre la edad y los % de los valores de peso y superficie derecho e izquierdo de cada gyri del LL. Mientras que con el avance de la edad en el LL del hemisferio derecho los % de peso y de superficie cortical del GPH aumentan (r: 0.55; $p < 0.02$ y 0.45; $p < 0.05$) los del GCA disminuyen (r: -0.62; $p < 0.01$ y r: -0.58; $p < 0.01$). Las variaciones de los % del GCP no son significativas. Al avanzar la edad se modificaría la relación porcentual de los gyri del LL derecho. El dato interesa si se tienen en cuenta funciones en que está involucrado el LL como la emoción, la regulación endocrina y la memoria.

184. Administración crónica in ovo de epipregnanolona: Efectos sobre las características funcionales del receptor GABA_A en el SNC. Leonardo Pignataro, Alba Mitridate de Novara y Sara Fiszer de Plazas

Instituto de Biología Celular y Neurociencias, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Previamente hemos demostrado la síntesis de un esteroide endógeno 5 β -reducido, 3 β -hidroxilado, epipregnanolona, en el SNC de las aves en desarrollo. El objetivo del presente trabajo fue investigar el efecto de la administración crónica de este neuroesteroide sobre las características funcionales del canal de Cl⁻ asociado al receptor GABA_A mediante experimentos de captación de ³⁶Cl⁻. A tal fin se utilizaron preparaciones de microsacos obtenidas a partir de lóbulos ópticos de embriones de pollo controles

(administrados con vehículo) y tratados (administrados con 30 μ M de epipregnanolona). Los resultados obtenidos demuestran que este tratamiento redujo la captación máxima de Cl⁻ (de 51.48 \pm 4.21 a 38.00 \pm 2.93 nmoles de Cl⁻ captados/mg. prot., $P < 0.05$) sin cambios significativos en la EC₅₀ del GABA para inducir esta captación (26.24 \pm 4.62 y 21.13 \pm 5.08 μ M). La alopregnanolona produjo una estimulación concentración-dependiente de la captación de Cl⁻ inducida por 5 μ M de GABA en ambas preparaciones, resultando su E_{max} reducido por el tratamiento sin observar cambios significativos en su EC₅₀. Estos resultados indican que la epipregnanolona administrada crónicamente es capaz de desacoplar la inducción mediada por GABA de la apertura del canal de Cl⁻, afectando de esta manera el funcionamiento del complejo receptor GABA_A.

185. Capacidad neurotóxica del Líquido Cefalorraquídeo de pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica en cultivos neuronales primarios de corteza cerebral de ratón. Karina Ricart, Roberto Sica*, Andrés Villa*, Mónica Fiszman

Laboratorio de Neurociencias, Centro de Investigaciones Médicas Albert Einstein. * División Neurología, Hospital Ramos Mejía, Buenos Aires

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa que afecta a las motoneuronas corticales, bulbares y espinales. La etiología de la pérdida neuronal gradual es desconocida. Hallazgos bioquímicos, anatomopatológicos y genéticos (mutaciones en el gen de la enzima SOD), sugieren que el exceso de glutamato y el estrés oxidativo estarían involucrados en la patogenia de la enfermedad. El objetivo del trabajo fue investigar la existencia de factores solubles presentes en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con ELA que disminuyan o afecten la viabilidad neuronal. El efecto de los LCR fue comparado con modelos de excitotoxicidad (NMDA) y estrés oxidativo (H₂O₂) establecidos en el laboratorio. Se expusieron cultivos de corteza de ratón a LCR diluidos al 50% de pacientes con ELA, controles neurológicos y controles quirúrgicos. La viabilidad neuronal se estudió 24 hs. más tarde. **Resultados:** Se observó una disminución significativa de la viabilidad neuronal en los cultivos expuestos a LCR de pacientes con ELA (39, 47, 55, 56% de disminución con respecto al control), mientras que no hubo disminución en los cultivos tratados con LCR de controles neurológicos, ni quirúrgicos. El efecto neurotóxico se observa en las mismas condiciones *in vitro* que se utilizan para visualizar la excitotoxicidad por 300 μ M de NMDA. La magnitud de este efecto es similar a la que se observa tras la exposición con concentraciones bajas de H₂O₂ (15 μ M). Los resultados sugieren que el calcio y el estrés oxidativo intervienen en la muerte neuronal. La intervención farmacológica selectiva en los cultivos nos permitirá identificar las sustancias involucradas en este efecto.

186. Síntomas psiquiátricos y conductuales en Demencia tipo Alzheimer: Predicción según nivel de deterioro. Carlos Mangone¹, Ana de Pascale¹, Denise Bauman¹, Sara Malagold¹, Gustavo Stein¹, Raúl Arizaga², Ricardo Allegri³, Juan Ollari⁴

¹ Neurología, Hospital Santojanni; ² Neuroepidemiología, ³ Instituto Nacional de Servicio Social de Jubilados y Pensionados INSSJP; ⁴ Neurología, Hospital Borda, Buenos Aires.

Objetivos: determinar que síntomas conductuales y psiquiátricos son esperables según el nivel de deterioro cognitivo del paciente **Metodología:** fueron evaluados 50 sujetos con DTA con el MMSE, la escala GDS y la escala Behave-AD (Reisberg). Esta última evalúa los síntomas conductuales y psiquiátricos **Resultados:** la edad fue de 69.38 \pm 6.37 años, 64 mujeres, con 8.24 \pm 4.1 años de educación. El 52% presentaban un deterioro leve (GDS 3-4) y 48% moderado a severo (GDS 5-6). El MMSE fue 17.06 \pm 6.84 y el Behave-AD total fue de 6.38 \pm 5.18. El análisis de regresión múltiple nos mostró que en los deterioros leves (MMSE 22.9 \pm 3.9) las ideas delirantes son el mejor modelo predictor. Cuando

analizamos a los más deteriorados (MMSE 12.10 ± 5.7) el mejor modelo fue la combinación de síntomas conductuales (despertarse varias veces durante la noche, conductas antisociales, desconocimiento de su propia casa, modificaciones en el hábito alimentario e irritabilidad) y psiquiátricos (ideas delirantes de abandono, o de que la gente que habla por la televisión está dentro de su propia casa). **Conclusiones:** Según el nivel de deterioro cognitivo del paciente se puede sospechar el tipo de síntomas conductuales y psiquiátricos probables, permitiendo esto actuar previamente desde lo terapéutico farmacológico con el paciente y desde lo instructivo (estrategias pertinentes) con el cuidador.

187. Receptores para vasopresina V1A en la médula espinal de ratas con tratamiento neonatal con monosodio glutamato (MSG). Verónica Dorfman, Cristina Vega y Héctor Coirini

Laboratorio de Neurobiología, IBYME - Departamento de Bioquímica Humana - Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

La presencia de fibras conteniendo vasopresina en la médula espinal ha sido previamente descripta por inmunocitoquímica. Si bien la función de este péptido en este tejido no está dilucidada aún, receptores para vasopresina del tipo V1A (R-V1A) fueron localizados en motoneuronas de la región lumbar. Estos receptores serían modulados por andrógenos testiculares. En el presente trabajo estudiamos el efecto del tratamiento neonatal con MSG sobre la distribución y densidad de R-V1A. Secciones coronales de la región lumbar 5-6 de ratas hembras y machos, controles (C) y MSG (n=6/grupo) fueron incubadas en presencia de 20pM de [¹²⁵I]-Antagonista Lineal para Receptores de Vasopresina, sin o con el agregado de vasopresina no radioactiva 1µM (unión no específica). Luego de 6 días de exposición los autoradiogramas generados se analizaron utilizando un sistema computarizado. Bajos niveles de unión específica del ligando fueron observados en tres regiones de la lámina IX siendo los valores obtenidos para C de 1,65 a 2,56 fmoles/mg para machos y de 1,07 a 2,07 fmoles/mg para hembras. En la región dorsomedial (DM) se observaron los menores valores de densidad de R-V1A. Los animales MSG macho a pesar de presentar hipogonadismo (peso testículo C: $3,8 \pm 0,2$ mg; MSG: $2,9 \pm 0,2$ mg) no mostraron cambios significativos en los niveles de R-V1A. En la región DM de hembras los niveles de R-V1A fueron cercanos a la unión no específica. Los resultados obtenidos indican la ausencia de dimorfismo sexual respecto a los R-V1A; y que de existir regulación por andrógenos, los niveles de testosterona presentes en los machos MSG serían suficientes para mantener una densidad de R-V1A similar a la de los animales controles. (Subsidiado por PIP 0819/98-CONICET y TM-12-UBA).

188. Perfiles de Polioles en el LCR de distintas Neuromatopatías Hereditarias (NMH). Alejandra Latini, Laura Laróvere, Raquel Dodelson de Kremer

CEMECO, Clínica Pediátrica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Numerosas NMH han sido perfectamente definidas, pero los pato-mecanismos de la neurodegeneración, permanecen sin elucidar en varias de ellas. En este trabajo se estudiaron los perfiles de Polioles (POH), productos de reducción de aldosas y cetosas y del mio-inositol (MI) en el LCR de distintas NMH con el objetivo de conocer las interrelaciones metabólicas del defecto genético con el metabolismo energético de los hidratos de carbono (HC) y del ciclo de los inosito-lesfosfatos. **Material:** LCR de 30 controles y de 15 pacientes (Pac). 1- Glucogenosis (G) I; 2- G VI; 3 y 4- Acidemia Glutárica I; 5- Síndrome de Lowe; 6 y 7- Gangliosidosis GM₂ Tipo II; 8- Deficiencia (D.) aspartoacilasa; 9 y 10- Mucopolisacaridosis (MPS) III; 11- MPS II; 12- Leucodistrofia Metacromática; 13- D. 3OH3metilglutarilCoA liasa; 14- D. parcial hipoxantina fosforibosil transferasa; 15- Aciduria Piroglutámica. **Metodología:** Cromatografía Gaseosa. **Resultados:** Pac1 al 12: disminución (más de 2SD) del MI (VN 769 ± 200µmol/L) en todos

los LCR excepto en una muestra temprana del P3 (3232 µmol/L), sin observar cambios en el resto del perfil. **Pac 13:** ↑ ribulosa (33; VN 4 ± 3µmol/L) y ribosa (18; VN 3 ± 2µmol/L); **Pac 14:** ↑ galactosa (189; VN 27 ± 13µmol/L); **Pac 15:** ↑ treitol (23; VN 3 ± 2µmol/L), eritritol (116; VN 31 ± 20µmol/L), xilitol (36; VN 4 ± 5 µmol/L) y xilulosa (14; VN 1 ± 1µmol/L). **Discusión:** La casi constante disminución del MI respondería a un mecanismo de excitotoxicidad mediada por receptores NMDA. En una etapa muy precoz, el aumento del MI (Pac 3) estaría reflejando el déficit energético característico de estas entidades. El incremento de diferentes POH en los Pac 13 al 15, señalan una clara alteración del metabolismo de HC; en particular el ↑ de galactosa en el Pac 14, hallazgo no descrito en esta NMH, que estimula a nuevas investigaciones con posibles implicancias terapéuticas.

METABOLISMO

189. La enzima degradante de insulina hidroliza ATP. María del Carmen Camberos, Juan Cresto

CEDIE, Hospital de Niños R. Gutiérrez, Buenos Aires.

La enzima degradante de insulina (EDI), es una thiol-metaloproteasa neutra, específica para insulina y altamente conservada durante la evolución. Nosotros hemos demostrado que EDI une ATP y que el nucleótido inhibe la actividad proteolítica sobre insulina. El objetivo de este estudio preliminar es determinar si EDI hidroliza ATP. EDI se obtuvo a partir de músculo de rata. La actividad ATPasa se midió usando γ -³²P-ATP según Rossi y cols, y se expresó en pmoles de fósforo liberado/h. EDI purificada presenta una V_{max} de 1.47 µM/h, y un Km de 35 µM. La azida sódica o la bacitracina aumentan la actividad de EDI aunque no llegan a tener significación estadística (EDI: 73 ± 13 , azida: 115 ± 22 ; bacitracina 152 ± 67). Al³⁺ y Li¹⁺ aumentan esta actividad (EDI: 26 ± 2 , Al³⁺: 85 ± 19 , p<0.05; Li¹⁺: 386 ± 183 , p<0.05). Vanadato u ortofenantrolina 1 mM la inhiben en forma total. N-etilmaleimida no modifica la actividad de EDI (EDI: 73 ± 13 ; N-etilmaleimide: 53 ± 26 , p: no sign). Insulina 100 nM la aumenta (EDI: 73 ± 13 , insulina: 187 ± 23 , p<0.02). Se concluye que EDI tiene actividad ATPasa. La asociación de ambas actividades (proteasa y ATPasa) podría caracterizarla como una proteína chaperona.

190. Inducción de óxido nítrico sintasa mitocondrial en hígado. Constanza Lisdero, Jorge Boczkowski, M. Cecilia Carreras y Juan J. Poderoso

Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires y Unidad INSERM 408, París, Francia.

Recientemente, se ha publicado la presencia de una óxido nítrico sintasa (NOS) en mitocondrias de hígado con una estructura similar a la NOS inducible. El objetivo de este trabajo fue el de determinar si la expresión de esta enzima se modifica en el transcurso de la sepsis. El estudio fue realizado en ratas Sprague-Dawley, la sepsis se indujo por la administración i.p. de LPS de E.coli (2mg/kg de peso). Los animales se sacrificaron a las 24 hs y el hígado fue extraído, homogeneizado. Las mitocondrias fueron aisladas por centrifugación diferencial y purificadas en un gradiente de Percoll. Se estudió la presencia de iNOS, la actividad enzimática y el requerimiento de cofactores de la NOS en homogenato total, citosol y mitocondrias purificadas. Los resultados mostraron, que tanto la actividad (Mitocondrias C: 3.0 ± 0.7 vs sépticas: 8.5 ± 1.5 nmoles/min/mg prot, (p<0.05) como la presencia de la NOS mitocondrial aumentan durante la endotoxemia. A su vez, también se detectó la presencia de la iNOS citosólica asociada a la membrana interna mitocondrial. Esta enzima mostró una total independencia de la presencia de cofactores en el medio de reacción, indicando esto que el medio intramitocondrial posee los cofactores necesarios para sostener la actividad de la NOS. De los resultados obtenidos se puede concluir que las mitocondrias de hígado expresan una isoforma de NOS y que su expresión está aumentada en la sepsis.

191. Agregación eritrocitaria y diabetes. Mabel D'Arrigo, Patricia Foresto, Larisa Carrera, Raúl Etchepare Cuezco, Liliana Racca, Juana Valverde, Rodolfo Rasia

Departamento de Bioquímica Clínica - Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas - Universidad Nacional de Rosario

La agregación de los glóbulos rojos (GR), juega un importante papel en el flujo sanguíneo, particularmente en la microcirculación. Su estudio es importante en vasculopatías, como en diabetes, aterosclerosis, hipertensión arterial, etc. El objetivo de este trabajo fue estudiar la agregación por análisis de la morfología de los agregados eritrocitarios, en individuos sanos y diabéticos. Este estudio se realizó en 21 pacientes diabéticos y en 30 individuos normales. La agregación eritrocitaria se estimó a través un parámetro de forma adimensional: ASP, definido como la relación entre el área proyectada de los agregados respecto del perímetro. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio invertido y digitalizadas con una video cámara, observándose formas alargadas típicas del rouleaux en agregados normales y formas esferoidales irregulares en estructuras de agregados anormales. Los valores de ASP en diabéticos fueron $0,65 \pm 0,18$ y resultaron significativamente mayores que en individuos normales con valores de $0,28 \pm 0,15$ ($p < 0,00001$). El incremento de la agregación en diabéticos podría atribuirse a la desialización de la glicoforina A, portador de la carga mayoritaria de la membrana del glóbulo rojo. Este parámetro, ASP, ha demostrado ser de utilidad para medir desviaciones en la morfología de los agregados.

192. Efecto del tratamiento preventivo con aspirina sobre algunas de las complicaciones de la diabetes. Fabiana Caballero, Esther Gerez, Alcira Batlle, Elba Vazquez

Centro de Investigaciones sobre Porphirinas y Porphirias (CIPYP), CONICET, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Las complicaciones de la diabetes están asociadas con alteraciones en la estructura y función de proteínas debido a la glicosilación y a la generación de radicales libres. La aspirina inhibe la glicosilación por acetilación de los grupos amino libres. El objetivo de este trabajo es investigar el efecto de la aspirina por administración *in vivo* durante corto y largo plazo a ratones con diabetes experimental. Ratones machos *CF1* recibieron una única dosis *i.p.* de streptozotocina (200 mg/kg) y ácido acetilsalicílico (0,16% p/p) durante 7 ó 45 días. Las inhibiciones, características en el estado diabético, de las actividades de las hemoenzimas d-aminolevulínico dehidratasa (50%, VN=22,68 \pm 3,35 U/mg) y deaminasa (30%, VN=0,53 \pm 0,12 U/mg), fueron revertidas por ambos tratamientos con aspirina. Los niveles de TBARS aumentaron significativamente (175%, VN=135.10⁻³ \pm 24.10⁻³ nmol/mg) en los animales diabéticos. Tanto el tratamiento a corto como a largo plazo bloqueó la acumulación de aldehídos lipoperoxidativos. En los animales diabéticos la actividad de catalasa aumentó un 100% respecto a los controles (VN=1,9. 10³ \pm 0,2.10³ U/mg). Sólo el tratamiento a largo plazo con aspirina revirtió parcialmente este incremento. Nosotros proponemos aquí que el estrés oxidativo juega un rol importante en los animales con diabetes inducida y que la aspirina podría prevenir o disminuir la modificación química de proteínas susceptibles al estrés glicémico.

193. Perfil hematológico en ratas diabéticas eSS. Stella Daniele, Hector Rodríguez, Stella Martínez, María Tarrés, Silvana Montenegro, Lida Morisoli

Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Bioquímicas. Cátedra de Biología, Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Rosario

La rata eSS, genéticamente diabética, presenta una diabetes tipoll que se manifiesta más severamente en los machos. Se estudió el perfil hematológico en 12 machos eSS y en 10 machos Wistar(W)(controles eumetabólicos), ambos de 12 meses de edad.

En sangre con EDTA se determinaron: leucocitos(GB/mm³), glóbulos rojos(GB/mm³), plaquetas (Pq/mm³), hematocrito (Hto%) y la hemoglobina(Hb g/dl), mediante el uso de contador hematológico. La fórmula leucocitaria relativa se efectuó sobre extendidos teñidos con May-Grünwald-Giemsa. Se encontró ligera leucopenia (eSS: 5175 \pm 1827 vs W: 7280 \pm 2004, $P < 0,05$), con disminución significativa de GR (eSS: $6,9 \times 10^6 \pm 54$ vs W: $7,83 \times 10^6 \pm 23$), Hto(eSS: 34 \pm 2,95 vs W: 37,6 \pm 1,37) y Hb (eSS: 11,9 \pm 0,76 vs W: 12,94 \pm 0,41); $p < 0,001$ y un aumento significativo en el número de Pq (eSS: $960,9 \times 10^3 \pm 19,6$ vs W: $870,2 \times 10^3 \pm 116$) $p < 0,001$. En la FLR se observó un aumento en los Neutrófilos (eSS: 41,3 \pm 8,8% vs W: 19,2 \pm 10,5%; $p < 0,001$), una disminución en los Linfocitos (eSS: 54,0 \pm 9,8% vs W: 77,6 \pm 10,4%; $p < 0,001$) y un ligero aumento en los Eosinófilos (eSS: 3 \pm 1,1% vs W: 1,4 \pm 1,5%) $p < 0,05$. En las eSS se encontró salida de elementos inmaduros de la serie roja a sangre periférica. Se concluye que el tiempo de evolución del síndrome diabético provocó en las ratas eSS, anemia, ligera leucopenia con neutrofilia y linfopenia, e hiperplaquetosis.

194. Efecto de la administración de sacarosa sobre el metabolismo de glucosa en islotes aislados de Langerhans. Laura Massa, Inés Borelli, Hector del Zotto, Juan José Gagliardino

Centro de endocrinología Experimental y Aplicada CENEXA (UNLP-CONICET), Universidad de la Plata

La administración de sacarosa a hamsters jóvenes produce cambios funcionales (disminución umbral de glucosa y aumento de la cantidad de insulina liberada) y morfológicos (aumento de neogénesis y de replicación celular) en el páncreas endocrino. El objetivo del trabajo fue correlacionar los cambios funcionales con el metabolismo de glucosa (G) insular. Hamsters (21 días de edad) recibieron dieta estándar y sacarosa al 10% en el agua de bebida (S) o agua corriente (C) durante 5 semanas. Al sacrificio se extrajo sangre para determinar glucemia e insulinemia y el páncreas para aislar islotes. En islotes aislados incubados con G 3 y 16 mM se midió secreción de insulina, oxidación y utilización de G (producción de ¹⁴CO₂ y de ³H₂O a partir de G-U-¹⁴C y G-³H respectivamente). Resultados: Glucemias S = C; insulinemias S > C (ng/ml) 2.3 \pm 0.1 vs 0.6 \pm 0.03, $p < 0,001$. Secreción insulina *in vitro* (ng/i/h) S > C (G 3mM 1.9 \pm 0.1 vs 0.7 \pm 0.2, $p < 0,001$; G16mM 6.9 \pm 0.2 vs 2.9 \pm 0.3, $p < 0,001$). Producción de ¹⁴CO₂ (pmol/ngADN/min) S > C (G 3mM 0.3 \pm 0.01 vs 0.2 \pm 0.01, $p < 0,01$; G 16mM 1.4 \pm 0.2 vs 0.9 \pm 0.1, $p < 0,01$); producción de ³H₂O (pmol/ngADN/min) S > C (G3mM 0.3 \pm 0.02 vs 0.15 \pm 0.01, $p < 0,01$; G16mM 1.5 \pm 0.2 vs 0.8 \pm 0.1, $p < 0,01$) Conclusión: El aumento de la secreción de insulina inducido por sacarosa sería consecuencia, al menos en parte del aumento de la metabolización insular de glucosa.

195. Posible rol regulador del INGAP sobre la neogénesis insular inducida por administración de sacarosa a hamsters normales. Héctor Del Zotto, Laura Massa, Juan José Gagliardino

Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (UNLP-CONICET), universidad de La Plata.

Objetivo: correlacionar cambios inducidos en la replicación y neogénesis de células insulares y en la proteína asociada a la neogénesis insular (INGAP) por administración de sacarosa. Se emplearon Hamsters de 21 días que recibieron dieta estándar y 10% de sacarosa en el agua de bebida (S) o agua corriente (C) durante 5 o 21 semanas. Al sacrificarlos se tomaron muestras de sangre (glucemia e insulinemia) y del páncreas (inmunohistoquímica y morfometría). La glucemia fue similar en todos los grupos pero la insulinemia fue mayor en S5 y S21. Se registró un aumento de la masa de células B ($p < 0,02$), del número de islotes/mm² ($p < 0,0004$) y del índice de replicación de células B (BrDU, $p < 0,01$), en S5. Hubo aumento de la masa de células INGAP-positivas, un menor volumen insular ($p < 0,007$), y citoqueratina en células noB sólo en S5. En S21 vs C21 no se hallaron diferencias significativas en los distintos parámetros morfométricos analizados. Las células INGAP-positivas coexpresaron glucagon en % variable (C5 vs S5):

Islotes 47.1 ± 6.9 vs 39.4 ± 4.8 ; Células ductales $25.8 \pm 8\%$ vs $19.7 \pm 6.9\%$; Extrainsulares 23.1 ± 9.9 vs $36.3 \pm 9.5\%$. **Conclusión:** el aumento de la masa insular inducido por la sacarosa se debe al aumento de la replicación de células B y neogénesis insular, éste último regulado probablemente por el incremento del INGAP en células precursoras de células B. El INGAP sería un elemento potencial para prevenir y tratar situaciones caracterizadas por disminución de la población B insular.

196. Cambios ultraestructurales de la célula B pancreática inducidos por la administración de sacarosa a hámsters normales. Gisela Camihort, Héctor Del Zotto, Georgina Luna, César Gómez Dumm, Juan Gagliardino

Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (UNLP-CONICET), Universidad Nacional de La Plata.

Previamente demostramos que la administración de sacarosa a hámsters, incrementa la masa insular B y la secreción de insulina. El objetivo actual fue analizar y cuantificar, en las mismas condiciones experimentales, los cambios ultraestructurales de las células B. Para ello se administró a hámsters de 21 días de edad, sacarosa al 10% en el agua de bebida (S5) y agua corriente (C5) durante 5 semanas. Al sacrificarlos se tomaron muestras de cola del páncreas, se fijaron (glutaraldehído y tetróxido de osmio), y se estudiaron con un M.E de transmisión JEM-1200, diversos parámetros se cuantificaron por videomorfometría. Se obtuvieron diferencias significativas en los siguientes parámetros (C5 vs S5; cada valor se expresa por $50 \mu^2$): gránulos densos 25.7 ± 2.7 vs 12.8 $p < 0.03$; exocitosis 0.9 ± 0.2 vs 4.7 ± 0.3 $p < 0.0005$; fusión de gránulos 6.3 ± 0.9 vs 17.5 ± 3.8 $p < 0.04$; mitocondrias 4.8 ± 0.4 vs 6.1 ± 0.2 $p < 0.04$, y espacio intercelular $0.2 \pm 4.8 \pm 1.7$ $p < 0.05$. Conclusión: la administración de sacarosa produjo cambios ultraestructurales significativos en las células B de los animales S5, indicadores de hiperactividad celular (aumento de exocitosis, fusión de gránulos y mayor tamaño de las mitocondrias y espacio intercelular). Todos estos datos concuerdan con y confirman los resultados de hipersecreción de insulina y aumento de la masa insular B (microscopía de luz) demostrados previamente.

197. Modelo para el estudio de los cambios inducidos por la hiperglucemia en las células endocrinas del páncreas.

Flavio Francini, Hector Del Zotto, Juan José Gagliardino

CENEXA (UNLP-CONICET), Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, Universidad Nacional de La Plata

Objetivo: identificar y cuantificar los cambios inducidos por la hiperglucemia en las poblaciones celulares endocrinas del páncreas del *Bufo arenarum*. Se inyectaron machos adultos con solución glucosada (1g/100g de peso corporal) durante 4 días, o igual volumen de solución fisiológica. Luego se sacrificaron a distintos tiempos obteniéndose muestras de sangre para medir la glucemia y el páncreas para cuantificar células B y no-B (inmunoperoxidasa), neogénesis insular (citoqueratina CK19) y replicación celular (BrdU). Los animales tratados presentaron hiperglucemia luego de 2 y 4 días de tratamiento (23.5 ± 1.26 vs 122.6 ± 16.67 mg/% y 34 ± 4.02 vs 508.3 ± 115.9 mg/%, respectivamente) que se normalizó 5 días después de su interrupción (29.5 ± 3.17 vs 24.33 ± 4.15 mg%). Asimismo se observó: a) Disminución del área B; b) Disminución del número de islotes/mm²; c) Aumento del área glucagón-positiva; d) Incremento del área CK19 positiva en células periinsulares y endocrinas extrainsulares (simultáneamente positivas para glucagón y PP), algunas asociadas a ductos; e) Incremento del porcentaje de células B marcadas con anti-BrdU. Conclusiones: el aumento de replicación de células B y de la neogénesis insular en respuesta al aumento de la demanda de insulina, muestran gran capacidad adaptativa de la glándula del sapo al estrés metabólico, probando que el modelo es útil para estudiar agentes y condiciones que pueden modificarla.

198. Modificaciones del volumen extracelular en la rata diabética por aloxano. Verónica Di Loreto, Hilda Moreno, Rodolfo Puche, Martha Locatto

Cátedra de Química Biológica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario.

En trabajos anteriores hemos demostrado que en la rata diabética por aloxano, la tasa de filtración glomerular (GFR) y el flujo plasmático renal (RPF) están inversamente relacionados con los valores de glucemia. El objetivo del presente trabajo es determinar si estas alteraciones van acompañadas de modificaciones de volumen del espacio extracelular (ECF, espacio de inulina). Se utilizaron ratas machos (peso basal: 180 ± 20 g), 15 a 20 días post inducción de la diabetes, (20 mg de aloxano por 100 g) y sus respectivos controles. El ECF de la rata diabética se diferenció significativamente de los controles (C: 34 ± 4 ml/100 g. vs. D: 22 ± 3 ml/100 g; $p < 0.05$). Son causas probables de la reducción del ECF la poliuria (C: 9.87 ± 3.70 ml/24 hs vs. D: 39.4 ± 6.80 , $P < 0.01$) y el incremento en la excreción urinaria de sodio (C: 1.1 ± 0.3 mEq Na/24 hs vs D: 2.7 ± 0.5 $p < 0.01$). En animales intactos la sobrecarga de glucosa (glucemia C: 150 ± 13 mg/dL vs C+G: 570 ± 46 , $p < 0.001$) redujo significativamente el volumen del ECF (C: 34.12 ± 4 ml/100g vs. C+G: 16 ± 1.2 , $p < 0.01$) Estos resultados hacen presumir que la disminución del volumen del ECF es uno de los factores capaces de modificar GFR y RPF. La hiperglucemia es la principal variable relacionada con estas modificaciones.

199. Efecto del hexaclorobenceno sobre el metabolismo de la glucosa en ratas. Marta Mazzetti, Sandra Lelli, Leonor San Martín de Viale

Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Se ha informado que una alta ingestión de glucosa previene la producción de porfiria experimental y mejora los síntomas de la porfiria hepática humana. El objetivo de este trabajo es examinar el efecto del hexaclorobenceno (HCB), agente porfirinogénico, sobre el metabolismo de la glucosa. Se administró a ratas hembras de la cepa Wistar, HCB (1g/kg peso/día) durante 2,3,5y 6 semanas. Previo ayuno, se determinó el contenido de glucógeno hepático por el método de fenol-sulfúrico, mostrando valores aumentados en las ratas tratadas a los mayores tiempos (10.53 ± 0.93 vs 7.01 ± 0.77 $\mu\text{mol/g}$, Media \pm ES, $n=8$, $p < 0.05$), mientras que la glucosa sanguínea presentó valores similares a los de los animales controles. Sin embargo cuando se ensayaron por métodos espectrofotométricos las actividades de las enzimas hepáticas: piruvatocarboxilasa (PC), fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa (PEPCK) y glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa), se evidenció una disminución, a los mayores tiempos de tratamiento, de PC (0.11 ± 0.05 vs 0.23 ± 0.03 U/mg, Media \pm ES, $n=8$, $p < 0.005$) y PEPCK (40.95 ± 1.02 vs 80.83 ± 1.93 U/mg, Media \pm ES, $n=8$, $p < 0.005$), la G-6-Pasa mostró también una reducción de su actividad (0.34 ± 0.07 vs 0.53 ± 0.09 U/mg, Media \pm ES, $n=8$, $p < 0.05$). La piruvato quinasa no exhibió cambios. Se propone que las alteraciones producidas por el HCB en el metabolismo de la glucosa, podrían relacionarse con el efecto que el suministro de carbohidratos produce en pacientes con porfiria hepática.

200. Porfiria Variegata: Primer estudio en la población argentina. Identificación y caracterización de dos mutaciones nuevas. Adriana De Siervi, Victoria Parera, Laura Varela, Alicia Batlle, María Rossetti

CIPYP, CONICET, Departamento de Química Biológica, FCE y N, Universidad de Buenos Aires.

Las porfirias son enfermedades metabólicas que surgen como consecuencia de una deficiencia enzimática parcial de alguna de las enzimas del hemo. En la Porfiria Variegata (PV) este defecto se encuentra a nivel de la Protoporfirinógeno oxidasa (PPOx) que transforma el Protoporfirinógeno IX en Protoporfirina IX. Se caracteriza por presentar el síndrome agudo y el cutáneo. Es una patología genéticamente heterogénea habiéndose detectado alrededor de 20 mutaciones diferentes en el gen de la PPOx, responsables de esta porfiria. Nuestro objetivo es el estudio bioquímico

y molecular de pacientes con sintomatología de PV para llegar a un diagnóstico certero de la enfermedad y hacerlo extensivo a sus familiares con el fin de identificar a los portadores asintomáticos y asesorarlos acerca del contacto con los factores desencadenantes de esta porfiria. Hasta el momento el estudio genético, PCR y secuenciación cíclica del gen de la PPOx, nos permitió detectar 2 mutaciones aún no descritas en la literatura: en una paciente, una mutación puntual que produce cambio de aminoácido, R168H en el exón 6, que se confirmó como responsable de la porfiria mediante estudios de restricción en 25 individuos normales ya que la misma crea un sitio para la enzima NcoI y, en 2 pacientes no relacionadas, una inserción, insT13290 que produce corrimiento del marco de lectura. Estos resultados han permitido confirmar el diagnóstico de PV en estas pacientes.

201. Hemocromatosis y Porfiria Cutánea Tardía. Estudios genéticos. María Rossetti, Manuel Méndez, Victoria Parera, Adriana De Siervi, Alcira Battle

CIPYP, CONICET, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

La Porfiria Cutánea Tardía (PCT) es una enfermedad metabólica producida por deficiencia en la Uroporfirinógeno decarboxilasa (URO-D), desencadenada por factores como el exceso de hierro, el alcohol y compuestos policlorados. Se la clasifica en: familiar (PCT-F) y adquirida (PCT-A) según la URO-D en sangre esté disminuida o sea normal respectivamente. La hemocromatosis (HHC) es otra enfermedad metabólica que puede ser hereditaria o adquirida en la cual ocurre una sobrecarga de hierro en hígado. La expresión clínica de la HHC y la PCT es semejante. Se ha identificado el gen HFE de la HHC hereditaria y se han detectado las mutaciones responsables (C282Y, H63D y S65C). Nuestro objetivo se orienta hacia la búsqueda de estas mutaciones en pacientes argentinos con PCT-F y PCT-A para establecer si su presencia es un factor importante en la expresión clínica de la porfiria, empleando PCR, secuenciación cíclica y cortes con enzimas de restricción. Cuando se hizo evaluación estadística se empleó el test de Fisher. Los resultados de estudios preliminares indican que 6 de 15 pacientes con PCT-F y 7 de 10 pacientes con PCT-A son portadores de al menos un alelo mutado en el gen HFE. Estos datos sugieren que la siderosis hepática tendría un rol importante en la patogénesis de la PCT.

202. Paracetamol y anestésicos volátiles: Efecto sobre distintos metabolismos. Ana Buzaleh, Alcira Battle

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP), CONICET, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

La homeostasis del organismo requiere compuestos como el glutatión intracelular y otros con grupos SH. Una importante reducción del GSH conduce a una situación de estrés oxidativo y se propuso que la reducción producida en hígado por el Paracetamol, analgésico-antipirético, jugaría un rol en la hepatotoxicidad de drogas. El ataque agudo de la porfiria aguda, enfermedad farmacogenética, puede desencadenarse por varios agentes porfirinogénicos como los anestésicos Enflurano e Isoflurano. El objetivo fue estudiar el efecto del Enflurano e Isoflurano (1 ml/kg) sobre el metabolismo del hemo y el sistema metabolizante de drogas en animales tratados con Paracetamol (386 mg/kg). Las actividades enzimáticas y los niveles de P-450 se midieron según métodos descriptos (Gen. Pharmac. 28, 1997, 577). La actividad del ALA-S disminuyó (VN: U/mg=0,079 ± 0,040, VT: U/mg=0,055 ± 0,011, p<0,05) por acción del Paracetamol sólo o con anestésicos. La Hemo-ox se indujo (VN: U/mg=1,02 ± 0,58, VT: U/mg=3,05 ± 1,00; p<0,05) en respuesta al estrés. No variaron las enzimas PBGasa y Deaminasa. Los niveles de P-450 aumentaron 30% (VN: nmol/mg=0,110 ± 0,075) y la isoforma P-450E1 un 100% (VN: U/mg=23,24 ± 9,04); las enzimas de Fase II, Glucuronidasa (VN: U/mg=18,23 ± 6,74) y Sulfatasa (VN:

U/mg=20,43 ± 8,52), disminuyeron 30%. En conclusión, el Paracetamol indujo alteraciones en los metabolismos estudiados que se mantuvieron aún después de la anestesia.

203. Expresión de erbB-2 durante la diferenciación adipocítica de la línea celular fibroblástica normal Swiss 3T3L1.

Eleonora Pagano, María Sanchez Ruiz, Cynthia Zizola, Marcela Sandoval, Juan Calvo

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires y Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

El erbB-2 es un gen con capacidad transformante cuando se sobreexpresa en fibroblastos normales. Se lo ha encontrado amplificado en cánceres humanos y expresado en tejidos durante la embriogénesis pero no está descrito en células que no sean epiteliales. Extractos proteicos de células 3T3L1, cultivadas en medio DMEM-10% SFB hasta confluencia (C), tratadas con MIX-Dexametasona (MD) y diferenciadas, luego, con Insulina (I) se analizaron en SDS-PAGE 6%. Las bandas se detectaron con un anticuerpo policlonal por la técnica de Western blot. Se realizaron 3 experimentos que mostraron la misma tendencia. La densitometría de las bandas indica que a medida que la expresión adipocítica progresa, la expresión de erbB-2 desciende (C= 10843, MD= 9425, I= 6625 en unidades arbitrarias). Evaluando el papel de la heregulina (HER) como ligando del erbB-2 se cultivaron células en presencia (10 ng/ml) o ausencia de la misma y se diferenciaron como de rutina. El contenido total de ADN de las células tratadas fue mayor (p<0.05) que el de las sin tratar (C= 5.67 ± 0.02, C+HER= 6.61 ± 0.16, I= 7.11 ± 1.26, I+HER= 9.02 ± 0.38 ng ADN/pozo, promedio ± DS). La determinación de triglicéridos y de actividad de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa no mostró diferencias significativas entre los tratamientos. Conclusión: HER estimula la proliferación celular, con una posible correlación entre el proceso de diferenciación y la expresión de erbB2.

204. Adaptaciones fisiológicas compensatorias del estrés osmótico en anfibios. Romina Barrozo^{1,2}; Enrique Rodríguez³ y Alfredo Salibián^{1,2}

¹Programa de Ecofisiología Aplicada, Departamento Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján. ²Comisión Investigaciones Científicas-Buenos Aires. ³Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Frente al aumento de la osmolaridad externa, los vertebrados han desarrollado diversas estrategias consistentes en respuestas compensatorias de los desbalances hídricos y salinos provocados por la osmolaridad como factor de estrés ambiental. Se estudió el caso de *Bufo arenarum* en condiciones de laboratorio. Se mantuvieron dos grupos de sapos machos (107 ± 7 g, n = 10) durante 4 días a temperatura (20 °C) y fotoperíodo (12L/12O) constantes. Un grupo comprendió animales controles en agua dulce reconstituida (n = 5) y un segundo grupo de animales en ClNa hiperosmótico (300 mOsm; n = 5). Se determinaron los niveles séricos de proteínas totales, urea, glucosa, Na⁺, K⁺, Ca²⁺ y presión osmótica; también se midió el hematocrito. Las diferencias entre ambos grupos se evaluaron mediante ANOVA de un factor. En los sapos expuestos a la solución hiperosmótica se registraron aumentos significativos, respecto de los controles (p<0.01), en la uremia (18 ± 2 vs. 7 ± 1 mM), la natremia (162 ± 2 vs. 127 ± 3 mEq/L), y la presión osmótica (303 ± 6 vs. 240 ± 5 mOsm); el resto de los parámetros no se modificaron. Estos resultados preliminares muestran que en la especie estudiada existe al menos un mecanismo adaptativo "de emergencia" para tolerar en forma transitoria un cambio agudo en la presión osmótica externa, fundamentalmente por aumento de la concentración sérica de urea. [Subsidios de la UNLu y de la CIC].

205. Eritropoyetina y receptor de transferrina como índices de actividad eritropoyética Mabel Lardo, Silvia Gasparini, Claudio Carbia, Diana Grinspon, Norma Díaz.

Cátedra de Análisis Clínicos II, Sección Hematología. Departamento Bioquímica Clínica. FFyB. Departamento de Docencia Investigación. Sección Asesoría Científica. Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires.

En el humano el 80% del receptor de transferrina está localizado en la médula eritroide y existe una relación constante entre el receptor de membrana y el receptor soluble (RTf s) que permite medir la actividad eritropoyética medular. La determinación simultánea de RTfs y niveles de eritropoyetina (EPO) como estimulador eritropoyético son usados para investigar la fisiopatología de las anemias. Se estableció la correlación entre los niveles de EPO sérica y RTfs con los valores de hemoglobina (Hb) plasmáticos en 36 pacientes anémicos, adultos de ambos sexos agrupados en deficiencia de hierro más un proceso infeccioso o inflamatorio y anemia de los trastornos crónicos. La Hb fue dosada por método convencional y RTfs y EPO por método inmunoenzimático con anticuerpos monoclonales. La relación $\log EPO = 2,8884 - 0,1604 + Hb$ resultó estadísticamente significativa con un $p < 0,001$ y un $r^2 = -0,5393$ en los 36 pacientes. No se encontró relación lineal entre $\log RTfs/Hb$. Se *concluye* que si bien la disminución de Hb está en relación directa con la producción de EPO, la presencia de otros factores como citocinas supresoras en este grupo de pacientes, inhibiría la expresión del RTfs como resultado del aumento en la producción eritroide medular.

206. Diferencias morfométricas en la pulpa blanca esplénica de ratas diabéticas expuestas a distintos esquemas alimentarios. Alejandro Anzorena, Noriyuki Hisano, Jorge Barragán, María Tarrés, Stella Martínez, Silvana Montenegro, Alberto D' Ottavio

Cátedras de Histología y Embriología y de Biología (Medicina) y Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Rosario.

Partiendo de la conocida relación entre diabetes y deterioro de la respuesta inmune y del mejoramiento metabólico registrado en las ratas diabéticas autóctonas eSMT con alimentación restringida, se exploró en ellas la repercusión de dos esquemas alimentarios distintos sobre el estado de conservación de las áreas esplénicas inmunocompetentes. De 16 machos, 7 recibieron, diariamente y *ad libitum*, alimento comercial (Cargill) desde el destete hasta los 12 meses de edad (esquema irrestricto -I-) y los 9 restantes, idéntico alimento por 48 h consecutivas, seguidas de un ayuno de 24 h (esquema restringido -R-). Los animales fueron pesados y sacrificados con éter. Sus bazo, tras de ser pesados, fueron separados en una parte procesada para recuento celular en cámara de Neubauer y en otra, para su estudio morfométrico óptico mediante un dispositivo lineal ocular. El diámetro de la vaina linfática periarterial (linfocitos T) sumado al de la zona marginal (linfocitos B) (VLPA+ZM) y el de la VLPA fueron significativamente menores en I que en R.: 354.89 ± 28.11 mm vs 433.00 ± 35.58 mm, $p < 0.01$ y 202.77 ± 20.46 mm vs 262.08 ± 33.88 mm, $p < 0.05$, respectivamente. En cambio, la ZM; el peso relativo de los bazo (mg / 100 g peso corporal) y el recuento celular (N° células/ mg) no mostraron diferencias entre ambos esquemas. La disminución del diámetro VLPA+ZM en I, a expensas del menor diámetro de la VLPA, reforzaría la vinculación diabetes-células inmunocompetentes, abriendo interesantes perspectivas para futuros estudios inmunológicos en esta línea diabética.

RENAL A

207. Enalapril protege al tejido renal de la lesión crónica por hiperoxaluria. Jorge Toblli, Margarita Angerosa, León Ferder, Felipe Inserra

Laboratorio de Medicina Experimental. Hospital Alemán & Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Buenos Aires.

Experimentos de nuestro laboratorio a corto plazo demostraron protección de enalapril (E) en nefropatía hiperoxalúrica (Hypertension 1999; 33: 225-231). El objetivo actual fue determi-

nar el efecto de E a largo plazo sobre el modelo hiperoxalúrico por etilenglicol (ETG). Machos SD adultos, G1 control (n=6), G2 ETG (n=6), G3 ETG+E (n=6), G4 E (n=6), G1 con agua común. G2 y G3 con ETG 1%, G3 y G4 con E (20mg/L) en el agua, durante seis meses. Cada mes se determinó tensión arterial sistólica (TAS), y recolectó orina de 24hs. para oxalatos (Uox.) y clearance de creatinina (Cl.cr.). Todos los animales fueron sacrificados al 6to. mes para anatomía patológica (H&E, PAS, Masson). Las lesiones tubulointersticiales (LTI), atrofia tubular, infiltrado inflamatorio y necrosis, y nivel de fibrosis intersticial (FI) se valoraron por score (0-4) 0=aus; 1= leve; 2=mod.; 3=sev; 4= muy sev. Resultados ($\bar{x} \pm \text{sem}$) 6to. mes: sin diferencias significativas en TAS; a) Uox. ($\mu\text{g/g}$ rata/día) G1= $1,4 \pm 0,03$; G2= $13,2 \pm 0,8^*$; G3= $14,6 \pm 2^*$; G4= $1,6 \pm 0,07$; b) Cl.cr. (ml/min) G1= $1,23 \pm 0,01$; G2= $1,03 \pm 0,04\#$; G3= $1,21 \pm 0,01$; G4= $1,23 \pm 0,01$; c) Score LTI, G1= $0,2 \pm 0,11$; G2= $0,71 \pm 0,31\#$ G3= $0,31 \pm 0,15$; G4= $0,1 \pm 0,1$; d) Score FI, G1= $0,2 \pm 0,1$; G2= $1,8 \pm 0,7\#$; G3= $0,3 \pm 0,3$; G4= $0,1 \pm 0,05$. $p < 0,05$ *vs. G1&G4; # vs. G1, G3, G4. Estos resultados indican que E protege del daño TI en el modelo crónico de hiperoxaluria.

208. Nefropatía diabética. Correlación entre scores histológicos y parámetros clínicos. Jorge Toblli, Graciela DeRosa, Gabriel Cao, Miguel Nadal, Rúrico Ibarra

Hospital Alemán & Hospital de Clínicas, Buenos Aires.

Con el objetivo de evaluar la correlación entre técnicas morfológicas adicionales en patología y parámetros clínicos en Diabetes mellitus (DM) se realizó este estudio. Se examinaron 20 biopsias renales (BR) de pacientes con diagnóstico de DM, 10 tipo I y 10 tipo II. Sexo: masculino 14, femenino 6. Se evaluó: 1) esclerosis glomerular (EG); 2) expansión mesangial (ExMes); 3) hialinosis arteriolar (HA); 4) fibrosis intersticial (FI), mediante análisis morfométrico por conté de puntos, score semicuantitativo y fórmulas aceptadas. Resultados ($\bar{x} \pm \text{sem}$) al momento de la BR: a) tiempo de evolución DM: $12,8 \pm 0,4$ años (rango: 4-24). b) edad: 40 ± 8 años; c) creatinemia (Scr.) $1,43 \pm 0,05$ mg/dL; d) Proteinuria (Up) $8,07 \pm 2,3$ g/día; e) PAS $166,9 \pm 5,4$ mmHg; f) PAD $99,4 \pm 1,9$ mmHg. BR: EG $125,05 \pm 22,5$; ExMes $234,54 \pm 27,2$; HA $141,23 \pm 21,6$; FI $22,48 \pm 2,2$. Correlaciones (Pearson) significativas ($p < 0,05$): 1) EG con ascenso de Scr. y la PAS y PAD ($r=0,6889$ $r=0,7459$; $r=0,7766$). 2) ExMes con Scr., Up, PAS y PAD ($r=0,7291$; $r=0,8039$; $r=0,8703$; $r=0,85$). 3) HA con Scr. y la PAS y PAD ($r=0,7948$; $r=0,6875$; $r=0,9065$). 4) FI con Scr. y Up ($r=0,7948$; $r=0,8385$). Conclusiones: la buena correlación entre los scores histológicos utilizados y las manifestaciones clínicas en la DM, hacen aconsejable el empleo de esta metodología y sugieren el carácter multifactorial del deterioro progresivo de la función renal.

209. Expresión patológica de marcadores inmunohistoquímicos intersticiales en la nefropatía diabética. Jorge Toblli, Graciela DeRosa, Gabriel Cao, Miguel Nadal, Rúrico Ibarra

Hospital Alemán & Hospital de Clínicas, Buenos Aires.

El objetivo de este estudio fue evaluar la expresión anormal de marcadores inmunohistoquímicos (IHQ) en intersticio renal y su correlación con parámetros clínicos y fibrosis intersticial (FI), en pacientes con Diabetes mellitus (DM). Se examinaron 20 biopsias renales (BR) de pacientes con DM, 10 tipo I y 10 tipo II. Sexo: mas. 14, fem 6. Se empleó técnica de Streptavidina-Biotin y panel de ATC. monoclonales contra: 1) actina musculo liso (SMA); 2) CD68; 3) CD45; 4) colágeno III (COL-III); 5) colágeno IV (COL-IV). Se utilizó análisis morfométrico por conté de puntos, score semicuantitativo y fórmulas aceptadas. Se correlacionó el marcador IHQ con: a) creatinemia (Scr.), b) proteinuria (Up) y c) FI. Resultados ($\bar{x} \pm \text{sem}$) al momento de la BR: a) evolución DM: $12,8 \pm 0,4$ años (rango: 4-24). b) edad: 40 ± 8 años; c) Scr. $1,43 \pm 0,05$ mg/dL; d) Up $8,07 \pm 2,3$ g/día. Datos IHQ: 1) SMA-Interst. $5,8 \pm 1,8$; 2) CD68 $3,68 \pm 0,8$; 3) CD45 $5,18 \pm 0,9$; 4) COL-III $3 \pm 0,6$; 5) COL-IV $5,4 \pm 1,4$. FI (%): $22,48 \pm 2,2$. Correlaciones (Pearson) significativas ($p < 0,05$): 1) SMA-Interst. con Scr., Up y FI ($r=0,8156$;

$r=0,8901$; $r=0,844$). 2) CD68 con Scr.; Up y FI ($r=0,7341$; $r=0,8111$; $r=0,7601$). 3) CD45 con Scr., Up y FI ($r=0,7215$; $r=0,6934$; $r=0,6667$). 4) COL-III con Scr., Up y FI ($r=0,6682$; $r=0,8916$; $r=0,7027$). 5) COL-IV con Scr., Up y FI ($r=0,6408$; $r=0,9648$; $r=0,941$). Estos resultados expresan el rol preponderante del sector intersticial en la progresión de la nefropatía diabética.

210. Efectos de una intoxicación crónica con aluminio sobre el nefrón dista.

Stella Mahieu, Néstor Millen, Mónica Elías
Fisiología Humana. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe

En estudios previos hemos observado modificaciones en la excreción de electrolitos por el aluminio (Al). Nuestro objetivo fue evaluar los efectos de una intoxicación crónica con Al en ratas sobre la función de concentración y dilución de la orina. Ratas tratadas con $Al(OH)_3$ desde el destete y por 6 meses (80 mg/Kg peso ip 3 veces por semana) se estudiaron con técnicas convencionales de clearance: $n=5$ para la reabsorción de agua libre (T_c) y $n=5$ para la formación de agua libre (C_{H_2O}). Se compararon con controles $n=10$ distribuidas en igual forma. No se observaron cambios en la velocidad de filtrado glomerular (VFG) ni en el clearance osmolar. El T_c obtenido con manitol hipertónico y ADH disminuyó significativamente en las ratas tratadas: (T) $9,62 \pm 0,17$ vs (C) $10,67 \pm 0,39$; $p < 0,01$. No se observaron cambios en las pendientes de las líneas de regresión que describen el C_{H_2O}/VFG en función del V_m/VFG : (T): 0,61 vs (C): 0,65. Se encontró una reducción en la excreción de AMPc nefrogénico: (T) 46 ± 3 vs (C) 92 ± 5 pmol/min. La disminución del T_c podría ser consecuencia de una alteración en la permeabilidad al agua del tubo colector (TC) o de una disminución de la tonicidad medular. La falta de variación en el C_{H_2O} nos permite descartar cambios en la función del asa ascendente de Henle. Esto resultados sugieren que el Al estaría disminuyendo la respuesta del TC a la ADH.

211. Detección de fibronectina (Fn) en túbulos proximales (TP) de riñones controles (C) de rata y después de 40 minutos de isquemia (I).

Guillermo Petrini, Ester Saball, Marcela Salvarrey, Elena Ochoa*, M. Mónica Elías
Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas -UNR. IFISE - CONICET - Rosario.*

Se estudió el rol del TP en la producción de Fn y la secreción de la misma al espacio extracelular. Se trabajó con TP aislados de ratas (C) y sometidas a isquemia unilateral (I). Los TP se aislaron mediante la digestión con collagenasa y la purificación por centrifugación en gradiente de Percoll. Se determinó en los homogenizados de corteza los niveles de ATP, nmol/mg prot, ($C=13,4 \pm 1,2$, (n, 4); $I=8,2 \pm 0,8$, (n, 4); $p \leq 0,05$). En las muestras de TP (I) se encontró un aumento significativo en la liberación de LDH, y una disminución significativa de fosfatasa alcalina, mUI/mg prot, ($C=665,9 \pm 42,3$, (n, 4); $I=245,4 \pm 49,6$, (n, 4); $p \leq 0,05$). La presencia de Fn se estudió por Western blott y por ELISA competitivo. La Fn se reveló con un antisuero a-Fn obtenido en conejo. El estudio se realizó con muestras de la fracción enriquecida en TP y glomérulos, tanto de preparados C, como I y además con el medio de incubación de estas muestras durante 2 horas. En todas las muestras se observó señal positiva a Fn siendo mayor en las estructuras provenientes de tejidos isquémicos que en los controles. Los medios de incubación también revelaron señal positiva a Fn. El Western con anti-ICAM en glomérulos C e I fue positivo. Los resultados indican que las células del epitelio tubular de rata producen fibronectina, que su presencia se magnifica durante la isquemia y que es posible que esa proteína sea secretada de la célula al medio extracelular.

212. Estudio de la repuesta a angiotensina II (AT) en la vasculatura renal de ratas diabéticas.

Verónica García, Liliana Monasterolo, Mónica Elías
Area Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

En estudios previos la vasculatura renal de ratas tratadas con aloxano (150 mg/kg, s.c.) presentó, 7 días después, una mayor sensibilidad a noradrenalina (NA). El objetivo fue estudiar la respuesta vascular a AT en este estadio de diabetes y una posible relación con el sistema noradrenérgico. Se empleó el modelo de riñón aislado y perfundido. Se estudió la respuesta a AT en riñones controles (C n:8) y diabéticos (D n:7), y la misma respuesta en presencia de prazosin (P) 1mM en controles (C_p n:5) y diabéticos (D_p n:6). Luego de la estabilización se perfundió el órgano con concentraciones crecientes de AT (0.01-100nM), y se registraron las variaciones de presión manteniendo el flujo constante. En cada experimento se estimaron la respuesta máxima (R_{max} : % de cambio) y la concentración de AT que provoca un 110% de cambio (C_{110} : nM). La curva del grupo D se corrió a la izquierda y mostró mayor R_{max} versus C (R_{max} : C: $156,4 \pm 5,1$; D: $262,2 \pm 21,1$, $p < 0,001$; C_{110} : C: $2,9 \pm 0,4$; D: $0,8 \pm 0,2$, $p < 0,01$). El grupo D_p mostró menor R_{max} y mayor C_{100} versus D (R_{max} : D_p : $178,8 \pm 11,2$, $p < 0,01$; C_{100} : D_p : $2,2 \pm 0,5$, $p < 0,05$). No hubo diferencias estadísticas entre R_{max} de D_p , C y C_p . La vasculatura renal de ratas diabéticas mostró una mayor respuesta a AT, la cual disminuyó por acción del P, indicando la participación de receptores a1 en dicha respuesta. Dado que AT libera NA, la mayor respuesta a AT en riñones D podría estar mediada en parte por la mayor sensibilidad a NA antes descrita.

213. Efecto de la inhibición de la enzima de conversión (IEC) en la compensación de la función renal post-uninefrectomía (UNx).

Carlos Amorena, Angélica Muller, Mehdi Bizari y Myriam Mac Laughlin.
Instituto de Investigaciones Cardiológicas. Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

La remoción de un riñón pone en marcha mecanismos de compensación en el riñón remanente que le permiten conservar la homeostasis de los fluidos corporales. Los IEC mejoran la función de los nefrones remanentes después de una severa reducción de la masa renal. El objetivo de este trabajo fue determinar el rol de los IEC en la compensación de la función renal después de la UNx. Estudiamos ratas UNx 4 o 21 días (d) después de la operación. Cada uno de estos grupos se subdividió en: 1) Control (C) sin tratamiento y Enalapril (E) (10mg/kg.día desde 2 días antes de la UNx). El Filtrado Glomerular (FG) y el Flujo Plasmático Renal Efectivo (FPRE) se determinaron por el método de clearance en la rata despierta. El FG en el grupo E 4 d: $6,24 \pm 0,56$ (9) fue significativamente mayor que el del C 4 d: $3,97 \pm 0,70$ (13) ml/min.kg ($p < 0,01$). A los 21 días no hubo diferencias en el FG entre ambos grupos. El FPRE fue mayor en las ratas E 4 d: $34,19 \pm 4,17$ (8) ml/min.kg que en las C 4 d: $22,7 \pm 2,71$ (7) ($p < 0,01$). Los grupos de 21 días no presentaron diferencias en el FPRE. **Conclusión:** el tratamiento con IEC permite alcanzar una mayor compensación de la función renal a los 4 días. Veintiun días después de la UNx, el grado de compensación de la función renal es independiente de la enzima de conversión.

214. Efecto del bajo contenido proteico de la dieta materna sobre el desarrollo renal de las crías.

María Cecilia Courrèges, María Eugenia Macagno, Alberto Juan Monserrat
Centro de Patología Experimental, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

La reducción del número de glomérulos es uno de los factores que favorece la progresión de la enfermedad renal a la cronicidad. Se estudió la influencia de la malnutrición proteica durante la gestación sobre el desarrollo renal de la progenie. Ratas Wistar se alimentaron con dietas isocalóricas que contenían 8% ($n=4$) o 20% ($n=3$) de caseína durante toda la gestación y con dieta comercial durante la lactancia. Las crías de ambos grupos fueron sacrificadas a las 4 semanas de vida. Se determinó el número (N, $x \pm DS$), diámetro (D, $x \pm DS$) de glomérulos, el contenido de urea en suero y de homocisteína en plasma, a saber: machos 8% ($n=9$) N= 46686 ± 11576 , D = $61,25 \pm 16,22$ μ m; machos 20% ($n=10$) N= 69307 ± 5835 , D = $65,00 \pm 16,83$ μ m;

hembras 8% (n=11) N = 51359 ± 9531, D = 62,00 ± 7,22 µm; hembras 20% (n= 10) N= 61311 ± 7553, D = 69,00 ± 8,49 µm. Los resultados obtenidos indican diferencias significativas (p<0,05) en el número de glomérulos entre los grupos de 8% y 20% en ambos sexos en ausencia de diferencia en los diámetros, los valores de urea y de homocisteína. El estudio histológico no mostró diferencias cualitativas entre los distintos grupos. Por lo tanto la desnutrición proteica gestacional mediante la reducción del número de glomérulos podría actuar como inductor y condicionante de la progresión de la enfermedad glomerular a la cronicidad.

215. Efecto protector del aceite de pescado en la necrosis renal inducida por deficiencia de factores lipotrópicos. M. Cecilia Courrèges, Carla Caruso, Alberto J. Monserrat

Patología Experimental. Departamento de Patología. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.

Ratas recién destetadas alimentadas con dietas deficientes en factores lipotrópicos (DFL) (colina, metionina, B12, ácido fólico) desarrollan un cuadro de IRA. En este modelo estudiamos los efectos del aceite de pescado. Experimento I. Cuarenta ratas macho, Sprague-Dawley recién destetadas fueron divididas en 4 grupos: grupo 1 DFL, proviniendo los lípidos (20%) del aceite vegetal hidrogenado y del aceite de maíz; grupo 2 DFL proviniendo los lípidos del aceite de pescado ("menhaden oil"); grupos 3 y 4 similares a las dietas de los grupos 1 y 2, pero suplementadas con colina. Los animales recibieron la dieta *ad libitum* hasta su muerte o fueron sacrificados al día 21. La mortalidad en los 4 grupos fue 60, 0, 0 y 10% respectivamente. Las ratas de los grupos 2, 3 y 4 no mostraron daño renal. Las del grupo 1 mostraron necrosis tubular o cortical en las que murieron y lesiones reparativas en las sacrificadas. Experimento II. Similar al experimento I, excepto que se emplearon 45 ratas Wistar que fueron sacrificadas al 7º día. Todos los animales del grupo 1 mostraron necrosis renal; las ratas de los otros grupos no mostraron daño. En ambos experimentos la urea y la creatinina en sangre corroboraron los cambios morfológicos. Es esta la primera vez que se demuestra la acción del aceite de pescado en este modelo.

216. Efecto del aceite de coco sobre la composición de fosfolípidos renales en ratas alimentadas con dietas deficientes o suplementadas con colina. Myriam Matoso, María C. Courrèges, María del C. Fernández, Emir H. Speziale, Norma Sterin-Speziale, Alberto J. Monserrat

Centro de Patología Experimental. Departamento de Patología. Facultad de Medicina. Biología Celular. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

La deficiencia nutricional de colina induce insuficiencia renal aguda (IRA) en ratas recién destetadas. Este efecto es prevenido cuando la fuente empleada para aportar los lípidos de la dieta es aceite de coco. El objetivo de este trabajo fue investigar el efecto de dicho aceite sobre la composición de fosfolípidos renales en ratas alimentadas con dietas deficientes o suplementadas con colina. Ratas Wistar machos recién destetadas fueron divididas en cinco grupos alimentados durante 4 días con: G0, dieta comercial; G1, maíz sin colina; G2, maíz con colina; G3, coco sin colina; G4, coco con colina. Se empleó el riñón izquierdo para estudio histológico y el derecho para el análisis de fosfolípidos de papila, médula y corteza. Los resultados obtenidos demostraron que hasta el día 4 los riñones carecen de signos de necrosis. La masa total de fosfolípidos de las distintas porciones del riñón no sufrió cambios siendo los valores para la corteza (ng de P/ mg de tejido): G0 646,02 ± 157,09; G1 799,40 ± 225,71; G2 612,83 ± 137,55; G3 607,50 ± 123,47; G4 841,05 ± 146,87. El análisis cualitativo tampoco arrojó diferencias significativas siendo el % de los distintos fosfolípidos muy similar en todos los casos. Los resultados obtenidos indican que el efecto protector del aceite de coco sobre la IRA inducida por deficiencia de colina no se debe a una modificación de los fosfolípidos de membrana de los riñones de dichos animales.

TRANSPORTE

217. Caracterización y regulación por el citoesqueleto de actina de un canal iónico permeable al sodio del riñón murino. Marcelo Carattino^{1,2}, Alicia Damiano¹, Gustavo Timpanaro¹, Orlando Catanzaro², Horacio Cantiello^{2,3}

¹ Laboratorio de Canales Iónicos, Cátedra de Química General e Inorgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. ² Programa de Sistemas Vasodilatadores PROSIVAD-CONICET. ³ Escuela de Medicina de Harvard, Boston MA, USA.

El túbulo proximal del riñón es responsable del mayor porcentaje de reabsorción renal de sodio. Sin embargo, los canales permeables al sodio de esta región del nefrón no han sido previamente descritos en detalle. El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de canales iónicos apicales de corteza renal involucrados en el movimiento de sodio en condiciones normales y su regulación por el citoesqueleto de actina. Membranas celulares apicales de la corteza renal aisladas de ratones fueron obtenidas por precipitación con MgCl₂ y centrifugación diferencial; y reconstituidas en un sistema de membranas lipídicas para la observación de canales iónicos. En 12 experimentos donde la actividad espontánea de canales iónicos no fue observada, la adición de una concentración polimerizante de G-actina (1 mg/ml), indujo y/o estimuló la actividad de canales permeables al sodio. En estas condiciones la activación por actina es transitoria, lo que es consistente con una inhibición del canal cuando los filamentos de actina alcanzan cierta longitud. Los canales presentaron una conductancia de 7-12 pS en presencia de un gradiente de sodio (en mM) de 200:20. La presencia de Apx, un canal epitelial regulado por actina que fue recientemente aislado del epitelio tubular renal de *Xenopus laevis*, fue también demostrada en membranas renales de ratón. La proteína mamífera equivalente al Apx anfibio tendría un peso molecular aparente de 105 kDa. En síntesis, este estudio determina la presencia de un canal iónico permeable al sodio cuya actividad estaría regulada por el citoesqueleto de actina en el nefrón murino. La posible asociación estructural entre un Apx mamífero y los canales observados requerirá futuros estudios.

218. Canales regulados por forskolina en células K562. Carlos F. Kusnier, Horacio Cantiello, Basilio A. Kotsias

Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari y Laboratorio de Canales Iónicos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

La vía de la adenilato-ciclasa es una candidata como factor regulador de las corrientes iónicas dada su amplia distribución en las membranas. El objetivo de este trabajo es estudiar la probable regulación de las corrientes iónicas por esta vía en la línea celular K-562 perteneciente a una leucemia mieloide humana crónica. Por patch-clamp se registraron canales en las configuraciones de parche unido a la célula (cell attached) y con el parche escindido (inside out). En condiciones basales (140 mM de NaCl en baño y pipeta) los preparaciones fueron silentes y la introducción de forskolina 40 µM, activador de la adenilato ciclasa indujo la actividad iónica, como se verá un canal permeable al Cl⁻. En 6 células se midió la actividad de este canal en la configuración "cell attached" e "inside out". Para comprobar la selectividad al Cl⁻ se hizo el inside-out reemplazando el Na⁺ del baño por N-metil-D-glucamina comprobándose similar actividad del canal. Esto implica que el Na⁺ no permea a través del canal. Se obtuvieron curvas corriente-voltaje y se calculó la conductancia del canal. En la configuración cell attached la conductancia fue de 40 pSiemens y en inside out de 54 pS ya que la conductancia suele ser mayor cuando existe la misma concentración del ión permeable en ambos lados de la membrana. Tal es el caso del Cl⁻ en la configuración inside out. Además se observó un mayor conductancia cuando el Cl⁻ penetra en la célula que cuando sale: rectificación saliente.

- 219. Expresión de canales iónicos y no iónicos en sinciotrofoblasto de placenta humana a término.** Alicia Damiano^{1, 2}, Silvia González Perret², Marcelo Carattino², Horacio Cantiello², Basilio Kotsias³, Cristina Ibarra¹

¹ Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; ² Laboratorio de Canales Iónicos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; ³ Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

El sinciotrofoblasto de placenta humana a término carece de uniones estrechas y el transporte de metabolitos, iones, y agua entre la sangre materna y fetal se realiza exclusivamente por la vía transcelular. Nuestro propósito es comenzar a identificar los canales iónicos y no iónicos implicados en la función de transporte. Para ello se purificó el ARN total, y mediante la técnica de RT-PCR usando primers que flanquean zonas de nucleótidos altamente conservadas se amplificaron secuencias que codifican para el regulador del transporte de la fibrosis quística (CFTR) y para canales de agua (AQPs). Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis horizontal en geles de agarosa y los resultados obtenidos muestran que en sinciotrofoblasto se expresa una banda esperada de ~ 295 bp correspondiente al exón 13 del CFTR y otra banda de ~ 400 bp correspondiente a la zona NPA-NPA de las AQPs. Los estudios de Western blot se realizaron sobre una fracción de membranas apicales de sinciotrofoblasto utilizando dos anticuerpos monoclonales específicos para el CFTR humano, uno dirigido contra el dominio R y el otro contra el dominio C-terminal. En ambos casos se detectó una banda de ~170 kDa, que corresponde a la forma glicosilada de la proteína completa informada en otros tejidos humanos. En la misma preparación se observó una importante banda de ~160 kDa usando un anticuerpo policlonal dirigido contra un fragmento de la proteína apical de células epiteliales de túbulo renal de *Xenopus laevis* (Ap_x), la cual se informó que estaba asociada a un canal de sodio sensible a amiloride. Resta dilucidar la importancia fisiológica de la presencia de canales de Cl⁻, Na⁺ y agua identificados por biología molecular en el sinciotrofoblasto de placenta humana a término.

ENDOCRINOLOGIA C

- 220. Identificación de una nueva mutación en el gen de la tiroglobulina humana y su asociación a un nuevo marcador microsatélite.** Carina Rivolta, Fernando Mendivel, Christian Moya, Héctor Targovnik

Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica y División Genética del Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires.

El bocio hereditario frecuentemente resulta de cambios estructurales y funcionales en la proteína tiroglobulina (Tg) que alteran la síntesis de T₄ y T₃. Estos cambios surgen de mutaciones exónicas e intrónicas en el gen de la Tg y el modo de herencia es autosómico recesivo. Se ha identificado en un individuo con bocio congénito una delección en el ARNm del gen de la Tg de 138 bases entre las posiciones 5549 y 5686 correspondiendo al exón 30. Con el fin de determinar la causa de dicha delección se estudió el grupo familiar y el análisis de secuenciación del ADN genómico reveló en los dos hermanos afectados una transversión G→T en el sitio +1 donante de splicing del intrón 30. Además se ha identificado una secuencia del tipo STR (Short Tandem Repeat) polimórfica en el intrón 29 a 73 bases del comienzo del exón 30. Amplificando el ADN genómico por PCR y visualizando los productos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante se determinó que ambos hermanos enfermos portan el mismo alelo del marcador microsatélite por lo cual se podría establecer una asociación entre el polimorfismo y el defecto de tiroglobulina. El marcador microsatélite descrito será útil para el asesoramiento genético de familias que padecen distintas patologías tiroideas siendo éste un método rápido y confiable.

- 221. Generación de un inhibidor soluble por cultivos celulares en monocapa.** León Krawiec, Paula Aphalo, Hebe Durán, Lucía Policastro, Mónica Palmieri, Mario Pisarev, Guillermo Juvenal, Laura Bocanera.

Unidad de Actividad Radiobiología, Comisión Nacional de Energía Atómica. Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Los cultivos tiroideos en monocapa, producen un inhibidor citosólico de la tiroperoxidasa (TPO), que explica su pérdida de capacidad de organificar yodo días antes de la desaparición de la actividad de (TPO). Este inhibidor está ausente en tejido fresco y en folículos en suspensión. No posee especificidad tisular ya que los cultivos primarios en monocapa de macrófagos y la línea establecida 3T3 de fibroblastos lo producen con actividades inhibitorias de TPO del 94 y 50 % respectivamente. La presencia del inhibidor de TPO en un tejido que no la posee, supone su acción sobre más de un camino metabólico. Siendo máximo el tenor del inhibidor en el cultivo en confluencia, lo relacionamos con la inhibición por contacto, lo que supondría la inexistencia del inhibidor en cultivos tumorales. Sin embargo, las líneas epiteliales tumorales PDV y PDV/C57 transformadas químicamente "in vitro" manifestaron capacidades inhibitorias de 70 y 73% respectivamente y un cultivo primario de adenoma tiroideo inhibió 46%. Por el contrario tumores epiteliales producidos químicamente "in vivo" en ratones Sencar no poseían inhibidor citosólico, asemejándose a lo observado en piel y tiroides normales frescas. La generación de un tumor epitelial, en ratones "nude", por inoculación de células transformadas en placa, permite la aparición del inhibidor citosólico "in vivo". Esto supone que el pasaje celular por el estado de anclaje a la placa, produce la mutación responsable de la aparición del inhibidor. La mutación se mantiene luego del trasplante celular al animal vivo.

- 222. Acción del cinc sobre la termogénesis de la grasa parda.**

Angel Zaninovich, Ines Rebagliati, Marcela Raices, Adriana Weisstaub, Conrado Ricci, Karl Hagmüller.

Hospital de Clínicas e Ingebi, Universidad de Buenos Aires; Universidad de Graz, Austria.

El cinc (Zn) es un componente esencial de muchas enzimas que regulan los procesos metabólicos. En dosis supra fisiológicas tiene efectos tóxicos. Este metal inhibe la conversión de tiroxina (T₄) a triiodotironina (T₃) en la grasa parda y esa acción podría afectar la producción de termogenina en este tejido. Se estudiaron ratas Wistar de 300 g de peso fueron hechas hipotiroideas por la inyección i.p. de ¹³¹I. Luego se inyectaron a cada animal 300 ng (dosis de reemplazo) o 1500 ng de T₃/100 g de peso/día, s.c. por 2 días, en dosis divididas y se las colocó en cámara fría a 4°C. A la mitad de cada grupo se le inyectó, además, sulfato de Zn 10 mg/kg de peso/día, i.p., durante 2 días. Se dió muerte al animal, se extrajo la grasa parda interescapular y se aisló la mitocondria para medir la unión del guanosin difosfato (GDP) a las proteínas mitocondriales. Se estudiaron 5 ratas por grupo. En ratas normales sin tratamientos, la unión del GDP fué de 537 ± 61 (DS) pmol/mg proteína. El Zn redujo el binding a 186 ± 48 pmol/mg proteína (P<0.01). En ratas con dosis fisiológicas de T₃, la unión del GDP fué de 273 ± 17 pmol/mg protein y en las que recibieron Zn se redujo a 127 ± 39 pmol/mg protein (P<0.01). En ratas tratadas con dosis altas de T₃, la unión del GDP aumentó a 410 ± 10 pmol/mg protein, y se redujo a 140 ± 14 pmol/mg proteína luego de inyectar Zn (P<0.01). Los resultados sugieren que el Zn deprime la calorifénesis en la grasa parda por un mecanismo no relacionado con el bloqueo de la conversión de T₄ a T₃.

- 223. Acción del óxido nítrico sobre la peroxidasa tiroidea.**

Valeria Grossoni, Francisco Schöpfer, León Krawiec, María Carreras, Juan Poderoso, Laura Bocanera

Unidad de Actividad Radiobiología. Comisión Nacional de Energía Atómica. Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno. Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires.

La síntesis de las hormonas tiroideas se realiza en dos etapas: 1) organificación del yodo, 2) acoplamiento de las tirosinas iodadas. Es catalizada por la tiroperoxidasa (TPO), en presencia de tiroglobulina, yodo y H_2O_2 . Trabajos previos demuestran que el óxido nítrico (NO), inhibe la organificación. El objetivo de este trabajo fue verificar si dicho efecto se produce por inhibición de la TPO. Para ello se utilizó TPO de membranas tiroideas bovinas, extraídas con Tritón 0.1%, durante 3 hs y la actividad enzimática se determinó por incorporación de ^{125}I a tirosinas. Tratamientos de la TPO con concentraciones crecientes de NO (10-50 μM), producen una inhibición máxima del 58%. Esta inhibición sería consecuencia de la unión del NO al grupo hemo de la enzima, lo que provocaría un desplazamiento del pico de absorción de 411 a 403 nm (especie inactiva). Se estudió si la inhibición enzimática era reversible, comprobándose que lo era, luego de 7 minutos (C: 84470 (cpm ^{125}I / 0.1 mg prot) \pm 5260, TPO con NO: 62128 \pm 5008, TPO sin NO: 80411 \pm 3576). Sin embargo el pico de absorción no revirtió a 411 nm, pasando a 401 nm. Para ver si además de un efecto directo del NO existía otro indirecto, mediado por peroxinitrito, producido por la unión del NO y el anión superóxido, se incubó TPO con distintas concentraciones de peroxinitrito (150-600 μM), observándose una inhibición máxima del 50%. De estos resultados podemos concluir que el NO inhibe la actividad de la TPO de un modo directo y reversible por unión al grupo hemo e indirecto a través de la acción del peroxinitrito.

224. Efecto de la nicotinamida en la acción del ^{131}I sobre las tiroides. Marcos Agote, Guillermo Juvenal, Leon Krawiec, Laura Bocanera, Erica Kreimann, Alejandra Dagrosa, Mario Pisarev

División Bioquímica Nuclear, Unidad de Actividad Radiobiología Comisión Nacional de Energía Atómica y Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

El ^{131}I se usa en el tratamiento del hipertiroidismo y del cáncer diferenciado de tiroides, pero las dosis empleadas implican un peligro para las personas en contacto con el paciente. Para lograr el mismo efecto terapéutico con dosis menores de radioyodo se estudió el efecto radiosensibilizante de la nicotinamida en ratas normales y bociosas (por la administración de metilmercaptoimidazol, durante 15 días) de 120 gr de peso corporal (PC). Los animales recibieron dosis variables (25-500 μCi) de ^{131}I con y sin nicotinamida. Luego de un mes los animales fueron sacrificados y se determinó la relación peso tiroideo/PC. Se determinó la ADP-ribosilación de proteínas en homogenatos de tiroides incubados con 3H-NAD, así como el flujo sanguíneo luego de la inyección de ^{86}Rb . Resultados: la nicotinamida no alteró per se el peso tiroideo. Tanto las ratas normales como las bociosas mostraron una progresiva disminución de PT/PC con dosis crecientes de ^{131}I y esta acción fue significativamente magnificada por la acción de la nicotinamida ($p < 0.01$). Este fármaco no alteró la ADP-ribosilación pero aumentó 100% el flujo sanguíneo tiroideo ($p < 0.05$). Conclusiones: la nicotinamida tiene un significativo efecto radiosensibilizante sobre la tiroides sometida a dosis terapéuticas de radioyodo y esta acción se debe a un aumento de la oxigenación tisular. Estos resultados abren la posibilidad de su uso terapéutico en seres humanos. Subsidios de CONICET, SECYT y UBA.

225. Niveles de Cortisol, Estradiol y Progesterona en monas Cebus prepúberes y adultas: efectos del estrés y tratamiento con dexametasona. Mónica Lahoz, Margarita Porta, Carlos Nagle, Marta Torres, Armando Mendizábal

Centro de Investigación en Reproducción Humana y Experimental, CEMIC, Buenos Aires.

Para evaluar los efectos del estrés y tratamiento con dexametasona (DEX) sobre los niveles de estradiol (E) y progesterona (P), en relación a cortisol (C), monas Cebus prepúberes, <3 años (PP) y adultas, >5 años (A), fueron divididas en: I- PP (n=3), A (n=5) bajo estrés por inmovilización, sedación (Ketalar 10 mg /

Kg) y venipuntura femoral repetidas a tiempo 0, 1, 2, 4 y 24 hs. II- PP (n=3), A (n=5) idem I, más DEX i.m. 2mg/Kg a tiempo 0. Se dosó C, E y P por RIA. A tiempo 0, el C de PP y A fue alrededor de 80 ug/100ml. El estrés produjo un aumento sostenido de C mayor en PP, 4hs: 295 \pm 71 vs A, 4hs: 117 \pm 13 ug/100 ml en A). En PP, E (53 \pm 12 pg/ml) y P (5 \pm 1 ng/ml) fueron menores que en A (E: 300 \pm 50 pg/ml y P: 57 \pm 12 ng/ml) y no se modificaron bajo estrés, excepto por un aumento temporal de P en A luego de la 1ª maniobra. DEX suprimió el C en PP y en A a un 3% de los valores basales y al 1,5 y 4% respectivamente de los valores medidos bajo estrés. DEX no modificó E. En PP la P disminuyó de 3.6 \pm 0.8 a 0.4 \pm 0.1 ng/ml a las 24 hs de DEX. En A, P aumentó de 77 \pm 8 a 138 \pm 42 ng/ml a la hora, para retornar a valores basales a las 24 hs. Conclusión: la mona Cebus presenta altos niveles de esteroides desde la prepubertad sin perder su capacidad de respuesta al estrés, con incremento de C. La P prepuberal, suprimida por DEX al igual que C, sugiere un origen exclusivamente adrenal de P, a diferencia de las monas adultas.

226. Supersensibilidad al stress en ratas (IFL Nu) genéticamente hipoprolactinémicas en varios modelos experimentales en comparación con ratas wistar. Yanina Cisella, Gabriela Pulenta, Gabriel Vía y Graciela Jahh

Laboratorio de Reproducción y Lactancia, (LARLAC-CRICYT), Mendoza.

Las ratas IFL Nu son hipoprolactinémicas y alopecicas, con lactancia deficiente y alteraciones en el eje dopaminérgico. Estudiamos el efecto del stress en ratas IFL Nu o Wistar macho y en hembras en los 4 días del ciclo, el día 19 de preñez (G19), y OVX mas estrógeno (Eg, 2 μg) y/o progesterona (Pg, 5 mg x 2) para evaluar el impacto de los distintos ambientes hormonales sobre la sensibilidad al stress. El stress se provocó por traslado a una sala contigua al bioterio, exposición al éter por 2 min. y sangría por la vena de la cola (S1) y una segunda sangría 5 min después (S2). Se midió PRL, progesterona (Pg) y GH por RIA. Hubo grandes diferencias en la respuesta al stress en ambas cepas según el modelo estudiado. En ratas Wistar el S1 aumentó PRL solamente en proestro (P; co: 7 \pm 2; S1: 48 \pm 9) y en diestro 2 (D2; co: 4 \pm 1; S1: 15 \pm 5), mientras que el S2 siempre elevó PRL (P S2: 26 \pm 5; E, co: 13 \pm 5; S2: 42 \pm 12; D1 co: 11 \pm 3; S2: 53 \pm 16; D2, S2: 12 \pm 3; macho co: 12 \pm 3, S2: 26 \pm 4), salvo en G19 y en OVX+Pg y OVX+EgPg. En las ratas IFL Nu la PRL aumentó en S1 y S2 en todos los días del ciclo, con niveles de PRL siempre mayores que las Wistar y hubo respuesta en G19 y en OVX+EgPg. El stress no modificó GH en las ratas Wistar, mientras que esta cayó en las IFL Nu en P, estro, D2 y OVX. Las ratas Wistar tuvieron Pg mas alta y respuesta menor al stress que las IFL Nu. En conclusión, las ratas IFL Nu son mucho mas sensibles al stress que las Wistar. Las variaciones observadas entre los días del ciclo, la gestación y las respuestas al Eg y la Pg indican un rol modulador para el Eg e inhibitorio para la Pg de la respuesta al stress en ambas cepas.

227. Niveles sericos comparativos de prolactina en el tratamiento prolongado con los antagonistas D_2 -5HTA₂ Risperidona y Clozapina, en pacientes esquizofrénicos hospitalizados. Norberto Zelaschi, Juana Rodríguez, Sergio Gaitán, Sergio Panizzo, Azucena Sobrero, Angelica López, Fernando Archuby

Hospital Neuropsiquiátrico "Dr. A. Korn". Facultad de Medicina de la Universidad de La Plata.

Objetivos: Presentar nuevas evidencias sobre el efecto hiperprolactinémico sostenido causado por el antagonista D_2 -5HTA₂ Risperidona (Ris) comparado con su similar Clozapina (Cz) y un grupo de comparación (GC). **Método:** Se estudió un grupo de 20 pacientes, 11 tratados con Ris y 9 con Cz, presentando diagnóstico de esquizofrenia - Criterio DSM IV -; se incluyó un GC formado por 19 controles sanos. Se realizaron 3 extracciones de sangre por venipunción, en ayunas a las 8 AM, con frecuencia quincenal a cada uno de los paciente luego de un año de trata-

miento con dosis constante. La Prolactina (Prl) fue dosada en suero por radioinmunoensayo. **Resultados:** Las edades para los grupos Ris, Cz y GC fueron: $X \pm SD = 56 \pm 11.98$, 41 ± 6.92 y 25 ± 4.50 respectivamente. Se realizó el test de ANOVA con variables homogéneas utilizando \log_{10} de los valores obtenidos y comparaciones múltiples con el método de Tukey. ANOVA: $F=26.65$, $p=0.000000$; Tukey: GC (17.33 ± 4.33 ng/ml) vs Ris (33.03 ± 15.92 ng/ml) $p=0.001031$, GC vs Cz (10.22 ± 2.32 ng/ml) $p=0.007800$, Cz vs Ris $p=0.000125$. **Conclusiones:** Ris posee en la administración crónica claros efectos hiperprolactinémicos, contrariamente a lo observado con la Cz. El potente antagonismo preferencial sobre los receptores D_2 de la Ris es una plausible explicación de la discrepancia neuroendócrina hallada entre ambos antipsicóticos atípicos, los que exhiben un similar perfil farmacodinámico.

228. Efectos del fotoperíodo sobre la población lactotropa en golden hamster macho. Gloria Cónsole¹, Susana Jurado¹, Ricardo Calandra^{2,3}, Karina Zitta³, Fernando Riccillo¹, Celia Ferese¹, César Gómez Dumm¹

¹ Cátedra de Histología «B», Facultad de Ciencias Médicas;

² Cátedra de Endocrinología, Facultad de Ciencias Exactas;

³ Universidad Nacional de La Plata. Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires.

Las gonadotropinas y la prolactina cumplen un importante rol en el mantenimiento de la función gonadal normal en hamsters. En el presente estudio se investiga el efecto de la privación de luz sobre la población lactotropa adenohipofisaria. Grupos de 5 hamsters machos fueron mantenidos desde el nacimiento en fotoperíodos largos (FL: 14hs luz, 10hs oscuridad) o expuestos a fotoperíodos cortos (FC: 6hs luz, 18hs oscuridad) durante 8, 16, 22 y 28 semanas. Las hipófisis se procesaron para microscopía de luz. Los cortes histológicos se inmunomarcaron mediante anti-PRL-EnVision (Dako)-DAB. Se registraron los parámetros estereológicos por medio de un analizador de imágenes (Optimas). La densidad de volumen ($DV \times 10^{-2}$) y la densidad de células ($DC \times 10^{-4}$) presentaron descenso significativo ($p < 0.01$) en los grupos FC de 8, 16, 22 y 28 semanas respecto a los FL.

PRL	FL				FC			
	8s	16s	22s	28s	8s	16s	22s	28s
DV	5.1 ± 1.4	4.8 ± 1.1	5.8 ± 1.1	5.5 ± 0.8	2.3 ± 0.3	0.7 ± 0.11	2.0 ± 0.23	4.0 ± 0.9
DC	7.3 ± 1.4	6.8 ± 1.6	8.2 ± 1.5	7.8 ± 1.1	3.5 ± 0.5	1.1 ± 0.11	0.8 ± 0.45	1.1 ± 1.4

Concluimos que el estudio inmunohistoquímico cuantitativo permitió detectar marcadas alteraciones en el número de células lactotropas adenohipofisarias cuando se establecen FC con privación de luz, en correlación con los niveles séricos de PRL ya comunicados. Restan analizarse los procesos de síntesis, depósito y liberación regulados a nivel hipotalámico y paracrina intraglandular.

229. Cambios morfológicos en adenohipófisis de monos desnutridos. Susana Jurado¹, Gloria Cónsole², Evelia Oyhenart³, Celia Ferese², Héctor Pucciarelli³, César Gómez Dumm²

¹ Servicio Central de Microscopía Electrónica; ² Centro de Investigaciones en Genética Básica y Aplicada, Facultad de Ciencias Veterinarias. ³ Cátedra de Histología «B», Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata.

La desnutrición (dieta hipoproteica) determina una marcada reducción de la actividad hipofisaria y afecta la función de los órganos blanco. El presente trabajo investiga los cambios inmunohistoquímicos cuantitativos y ultraestructurales de las diferentes poblaciones adenohipofisarias en monos malnutridos. Se utilizaron 12 monos *Saimiri sciureus* (6 machos y 6 hembras), bajo dieta *ad libitum* 20% proteínas: controles y 10% proteínas: grupo experimental (2 años). Se procesaron las hipófisis para microscopía

de luz y electrónica. Se inmunomarcó con anti-GH,-PRL,-LH,-FSH,-ACTH,-TSH -EnVision-DAB. Se determinó la densidad de volumen (DV) y la densidad de células (DC) en un analizador de imágenes.

DV * $p < 0.05$	CONTROLES		MALNUTRIDOS	
	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS
PRL($\times 10^{-2}$)	2.6 ± 0.8	4.7 ± 1.2	$0.9 \pm 0.3^*$	$1.9 \pm 0.9^*$
GH($\times 10^{-2}$)	57.1 ± 8.9	33.6 ± 5.3	$22.6 \pm 4.4^*$	$16.7 \pm 3.7^*$
FSH($\times 10^{-2}$)	7.1 ± 0.9	6.6 ± 0.8	$2.6 \pm 0.5^*$	$2.1 \pm 0.7^*$
LH($\times 10^{-2}$)	16.4 ± 2.6	14.9 ± 2.5	$5.5 \pm 1.3^*$	$4.8 \pm 1.2^*$
TSH($\times 10^{-3}$)	9.3 ± 0.9	12.2 ± 0.4	$3.5 \pm 1.4^*$	$5.2 \pm 1.8^*$
ACTH($\times 10^{-2}$)	6.6 ± 0.9	5.7 ± 1.1	$7.1 \pm 0.6NS$	$6.2 \pm 0.7NS$

La ultraestructura mostró alteraciones sugerentes de hiperfunción compensadora. Los hallazgos inmunohisto-químicos y ultraestructurales se correlacionan con las mediciones craneofaciales descriptas previamente.

230. Alteraciones endócrinas en ratones deficientes de receptor dopaminérgico D2 (RD2). Graciela Díaz de Torga, Claudia Feierstein, Diego Gelman, Malcolm Low, Marcelo Rubinstein, Carlos Libertun y Damasia Becú de Villalobos

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires.

El RD2 en la hipófisis anterior regula la secreción de prolactina (PRL) en forma inhibitoria. Usando ratones knockout para RD2 estudiamos la regulación del crecimiento, los niveles séricos de PRL e IGF-I, y de la liberación de PRL por angiotensin II *in vitro*. Se determinaron PRL e IGF I séricos a los 2, 4, 6 y 8 meses de edad en hembras (H) y machos (M) knockout (-/-), wildtype (+/+), heterocigotas (\pm). Los ratones -/-, H y M, desarrollaron hiperprolactinemia ya a partir de los 2 meses de edad (172.1 ± 19.0 y 101.3 ± 22.0 en H -/- y +/+; y 157.0 ± 33.8 y 61.2 ± 11.1 ng PRL/ml en M -/- y +/+, $p < 0.05$ para ambos sexos). La prolactinemia aumentó hacia los 8 meses sólo en las H-/. El peso corporal de H y M -/- fue menor que aquel de los +/+ ó \pm a partir de los 4 meses de edad. En forma correlativa los niveles séricos de IGF fueron inferiores en ratones -/- a los 2, 4 y 6 meses (2 meses: H 2068 ± 270 y 2756 ± 202 ng/ml, para -/- y +/+ $p < 0.05$). A los 8 meses de edad los animales se sacrificaron, y las hipófisis se procesaron para cultivo celular. Las H-/- presentaron un tumor hipofisario. La liberación de PRL por angiotensina II (10 nM) *in vitro*, fue menor en H y M -/-, y, en todos los casos inferior en H. Concluimos que en ratones deficientes del receptor D2 está alterada la regulación tanto de PRL como de IGF-I, y que una diferente sensibilidad a secretagogos en los lactotropos D2-/- podría participar en la hiperprolactinemia e hiperplasia del modelo experimental.

231. La Leptina inhibe la secreción de Progesterona en cultivos de trofoblasto humano. Paula Cameo, Paul Bischof, Juan Carlos Calvo

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires y Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital Universitario, Ginebra, Suiza.

Durante el embarazo, la concentración de leptina, una proteína producida por adipocitos, se encuentra elevada en suero. Recientemente se mostró que la placenta humana produce leptina, pero todavía se desconoce el papel y su regulación en este órgano. Usando cultivos puros de células de trofoblasto, hemos medido la producción de progesterona en condiciones basales y después del agregado de distintas concentraciones de leptina recombinante humana (rhlep). Células del citotrofoblasto (CTB) fueron aisladas a partir de placentas normales a término (36-42 semanas). Por digestión con tripsina y un gradiente discontinuo de Percoll, se separaron de las células sanguíneas y del sincicio.

Posteriormente se inmunopurificaron con anticuerpos (anti CD45) acoplados a partículas magnéticas. Las CTB se incubaron por duplicado en DMEM en presencia (para la obtención de sinciotrofoblasto, STB) o ausencia de SFB y/o rhlep (1-2000 ng/ml). Se midió progesterona por RIA (sensibilidad: 0.02 ng/ml). Los resultados se expresaron como valores por mg de proteína \pm SEM. El análisis estadístico se realizó por ANOVA. A los 2 días de cultivo la rhlep (1 μ g/ml y 2 μ g/ml) inhibe significativamente la liberación de progesterona al medio en presencia (1 mg/ml: $p < 0.05$) o ausencia ($p < 0.01$, $p < 0.001$) de SFB 10%. A los 4 días de cultivo la secreción de progesterona también disminuyó en ambas condiciones ($p < 0.01$; $p < 0.05$). **Conclusiones:** Nuestros resultados son la primera evidencia de inhibición de la secreción de progesterona por leptina en placenta humana.

232. 21 deoxialdosterona, precursor para la síntesis extradrenal de aldosterona? Daniela Rogoff¹, Mark Foecking², Celso Gomez-Sanchez²

¹ Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Buenos Aires, ² H.S.TrumanVA Hospital and University of Missouri, Columbia, MO, USA.

La Aldosterona (A) se sintetiza principalmente a partir del colesterol a través de DOC. Una vía alternativa que involucra la 21 deoxialdosterona (21deoA) ha sido demostrada en tejido adrenal humano y de algunos animales. En algunas circunstancias (déficit de 21 hidroxilasa (21HO) e hiperaldosteronismo primario) la excreción urinaria de este metabolito está elevada. Ante las evidencias de actividad 21HO en tejido extradrenal, quisimos evaluar la posibilidad de conversión extradrenal de 21 deoA a A. Se estudiaron queratinocitos humanos (células HaCaT). La expresión del gen CYPc21 fue evaluada por RT-PCR. La presencia de actividad 21 HO fue evaluada incubando las células con progesterona marcada (P4) y midiendo la producción de DOC. La conversión de 21deoA a A fue valorada incubando las células con 21deoA marcada y midiendo la A formada después de extracción y separación por TLC. La 21deoA fue sintetizada a partir de A por incubación con *Eubacterium lentum*. No se detectó expresión del gen CYPc21 en estas células. La P4 fue metabolizada extensamente. Sólo el 5-7% de P4 fue convertida a DOC. El 5-8% de la 21deoA fue transformada a A. Esta es la primera vez que se demuestra actividad 21HO en keratinocitos humanos adultos y que estos pueden convertir 21 deoA a A. La 21hidroxilación extradrenal de la 21deoA podría ser una fuente local o sistémica de un mineralocorticoide más potente y hasta ser el origen de aldosterona en aquellos pacientes con HSC por déficit de 21HO que recuperan la capacidad retentora de sal.

ENDOCRINOLOGIA D

233. Dimorfismo sexual en la tumorigénesis hipofisaria inducida por dietilestilbestrol (DES) en ratas F344. Luciana Pietranera¹, Gerardo Piroli^{1, 2}, Alicia Torres³, Claudia Grillo^{1, 2}, Alejandro De Nicola^{1, 2}

¹ Instituto de Biología y Medicina Experimental, ² Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires y ³ Centro de Microscopía Electrónica, Universidad Nacional de Córdoba.

Se ha demostrado que las hembras (H) F344 estrogenizadas crónicamente desarrollan prolactinomas más grandes que los machos (M), lo que revierte por androgenización neonatal con propionato de testosterona (TP). Ahora estudiamos por microscopía electrónica las características de los lactotropos de H, M y HTP gonadectomizados controles (C) y tratados con DES. A los 40 días de tratamiento, los animales H, M y HTP del grupo C presentaron lactotropos atípicos (tipo II y III). En los animales DES, los lactotropos revirtieron a la forma típica (tipo I); con un remanente de formas atípicas en MDES y HTPDES pero no en HDES. Por inmunocitoquímica, el número de células que expresaron LH fue menor en HDES (39.7 \pm 5.5 células/mm²) que en MDES (105.3 \pm

6.6, $p < 0.01$) y HTPDES (85.3 \pm 11.0, $p < 0.01$). Los lactotropos que presentaron inmunoreactividad para galanina fueron más numerosos en HDES (819.9 \pm 40.1 células/mm²) que en MDES (574.9 \pm 41.7, $p < 0.01$) y HTPDES (535.8 \pm 33.3, $p < 0.01$). **Conclusiones:** 1) La mayor proporción de lactotropos típicos correlaciona con el mayor patrón secretorio de prolactina descrito en HDES. 2) El menor contenido de gonadotropos explicaría la menor expresión de receptores para esteroides sexuales observada en HDES. 3) La mayor expresión de galanina en HDES correlaciona con el mayor tamaño tumoral descrito en este grupo, corroborando el rol postulado para dicho péptido en la proliferación de lactotropos.

234. Caracterización parcial de un principio activo de la Pars Tuberalis que estimula la liberación de prolactina desde la Pars Distalis. Martha Lafarque, Marcelo Ezquer, Liliana Oliveros, Luis Aguado

Laboratorio de Biología de la Reproducción, Departamento de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional San Luis.

Con anterioridad presentamos evidencias de que secreciones específicas de Pars Tuberalis (PT) bovina de naturaleza proteica liberan Prolactina (PRL) desde la Pars Distalis (PD) de rata. En este trabajo mostramos los avances en la purificación del factor/s de PT involucrado. Las PT fueron disgregadas en medio 199 con tripsina 0.25%. Las células fueron lavadas, cultivadas por 24 hs en medio 199 con antibióticos y sembradas en gradiente de Percoll. **Resultados:** Las células de las fracciones del 50 y 60 % de Percoll produjeron la mayor liberación de PRL (determinada por RIA) desde las células dispersas de PD. Dichas células de PT fueron cultivadas durante 48 hs, el medio fue centrifugado 8 hs a 22500 x g a 4 °C y sembrado en SDS-PAGE al 10%, obteniéndose 8 bandas de PM entre 109 y 30 kDa. Las proteínas eluidas del gel, se concentraron y utilizaron para estimular células de PD. Las bandas con actividad biológica presentaron un PM entre 77 y 106 kDa, indicando que ese sería el rango de PM correspondiente al factor/es proteico secretado por células específicas de la PT. Los resultados permiten especular que la PD sería su posible órgano blanco.

235. Estudio de la acción de péptidos en ganglio celiaco sobre la liberación de esteroides ováricos en ratas *in vitro* en diestro I. Nelson Villegas, Marisa Garraza, Miguel De Bortoli, Luis Aguado

Laboratorio Biología de la Reproducción. Universidad Nacional San Luis.

La inyección intracerebroventricular (icv) de adrenalina (Ad) produce en ratas en diestro I (DI) un aumento de Progesterona (P) ovárica con intervención del Nervio Ovárico Superior (SON). El objetivo fue estudiar si en el efecto mencionado, está involucrada la acción de: sustancia P (SP), péptido intestinal vasoactivo (VIP) y neuropéptido Y (NPY) sobre el Ganglio Celiaco (GC). A ratas hembras Holtzman de 250 \pm 25 g, bajo anestesia, se les extrajo el sistema GC-SON-Ovario(O). Se colocaron en celdas separadas el O y el GC unidas por el SON. El sistema se incubó en buffer Krebs-Ringer, a 37 °C en baño metabólico con el agregado individual previo en la celda ganglionar de los distintos péptidos y se determinó, por RIA, la concentración de P y Androstenediona (An) en el líquido de incubación del O, a los 30, 60, 120, 180 min. Se toma como basales los valores obtenidos solo con buffer en ambas celdas. **Resultados:** (medias \pm SEM ng/ml) P basal: 30'=0,076 \pm 0,01; 60'=0,086 \pm 0,01; 120'=0,10 \pm 0,01; 180'=0,12 \pm 0,01. Con NPY, VIP y SP, aumenta P en todos los tiempos ($p < 0.05$). An basal (medias \pm SEM pg/ml): 30'=3,4 \pm 0,36; 60'=3,5 \pm 0,35; 120'=3,9 \pm 0,5; 180'= 4 \pm 0,5. Con NPY, VIP y SP no se observan variaciones significativas en los tiempos estudiados. En DI, la acción de VIP, NPY y SP sobre GC produce aumento de P ovárica, similar a lo que se produce con Ad icv. Aunque no se observa un aumento significativo, en los tiempos estudiados, sobre An habría una tendencia opuesta a la obtenida en diestro II.

236. Respuesta fotoperiódica de la población gonadotropa en golden hamster macho. Gloria Cónsole¹, Ricardo Calandra^{2,3}, Susana Jurado¹, Fernando Riccillo¹, Karina Zitta³, Mónica Carino¹, César Gómez Dumm¹

¹ Cátedra de Histología «B», Facultad de Ciencias Médicas;

² Cátedra de Endocrinología, Facultad de Ciencias Exactas;

³ Universidad Nacional de La Plata. Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires.

La exposición de los golden hamsters a fotoperíodos cortos (<12.5 hs) determina una temprana regresión de los órganos reproductivos, seguida por una recrudescencia espontánea. Se investiga el efecto de la privación de luz sobre la población gonadotropa adenohipofisaria. Grupos de 5 hamsters machos fueron mantenidos desde el nacimiento en fotoperíodos largos (FL: 14hs luz, 10hs oscuridad) o expuestos a fotoperíodos cortos (FC: 6hs luz, 18hs oscuridad) durante 8, 16, 22 y 28 semanas. Las hipófisis se procesaron para microscopía de luz. Los cortes histológicos se inmunomarcaron mediante anti-FSH-LH-EnVision-DAB. Se registraron los parámetros estereológicos por medio de un analizador de imágenes (Optimas). La densidad de volumen (DV x10⁻²) y la densidad de células (DC x10⁻⁴) no mostraron alteraciones significativas en FC-FL.

	FL				FC			
	8s	16s	22s	28s	8s	16s	22s	28s
DVLH	7.1±1.2	8.3±0.2	8.4±2.2	6.8±2.6	8.3±1.2	7.1±0.4	9.9±2.2	8.2±0.9
DCLH	8.2±1.4	9.7±0.2	9.8±2.5	7.9±3.1	7.6±1.8	6.5±0.3	9.1±1.9	7.8±0.8
DVFSH	5.5±0.8	5.4±0.1	5.4±1.7	5.2±0.4	9.3±1.5	4.9±1.2	6.4±1.1	6.3±0.3
DCFSH	5.1±0.8	4.9±0.1	5.1±1.6	5.2±0.4	7.7±1.3	5.1±0.9	5.2±0.9	5.9±0.2

Debido a que nuestro grupo ha detectado descenso de los valores séricos de las gonadotropinas en FC, en futuros estudios serán analizadas las neuronas hipotalámicas GnRH que regularían la síntesis, depósito y/o liberación de LH-FSH en las células gonadotropas adenohipofisarias.

237. Influencia de la matriz extracelular en la morfología y función de la célula de Leydig, in vitro. Emilce Díaz¹, Eliana Pellizzari², Silvina Meroni², Selva Cigorraga², Livia Lustig¹, Berta Denduchis¹

¹ Centro de Investigaciones en Reproducción. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires; ² Centro de Estudios de Investigaciones Endocrinológicas. Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez". Buenos Aires

El objetivo de este trabajo es estudiar la influencia de las proteínas de la matriz extracelular (ME) sobre la morfología y la función de las células de Leydig (CL). Se aislaron CL de rata adulta y se cultivaron en placas recubiertas o no con laminina-1 (L-1), colágeno IV (C-IV) o fibronectina (FN) durante 3 ó 24 hs. La adhesión celular se determinó por un método colorimétrico (D.O. a 600nm en lector de ELISA). Las CL cultivadas sobre ME revelaron un grado de adhesión mayor; sin ME: 0.17 ± 0.01, L-1: 0.26 ± 0.01^{***}, C-IV: 0.26 ± 0.1^{***}, FN: 0.30 ± 0.01^{***} (X ± ES, n=8, ^{***}P<0.001). Dicho incremento correlaciona con la dosis de proteína utilizada (1-8 ug/hoy), L-1: 1.6-2.2, C-IV: 1.3-2.5 veces de aumento. Las células cultivadas durante 24 hs sobre L-1, C-IV o FN sufren un extenso proceso de "spreading" por el cual adquieren abundantes y largas prolongaciones a diferencia de las sin ME. Por inmunofluorescencia, se observó expresión de receptores de proteínas de la ME (integrina α₃β₁). Se detectó, una inhibición de la secreción de testosterona (T) (ng/10⁶ células) en el medio condicionado de las CL cultivadas sobre C-IV ó FN; sin ME: 8.1 ± 0.5, C-IV: 6.1 ± 0.2^{**}, FN: 6.5 ± 0.2^{**} a las 3hs; sin ME: 40.4 ± 1.7, C-IV: 12.8 ± 1.2^{**}, FN: 36.1 ± 1^{*} a las 24hs (X ± ES, n=8, ^{*}P<0.05; ^{**}P<0.01). Dicho efecto es revertido por anticuerpos anti-β₁. Los datos con L-1 indicarían que ésta no afecta la producción in vitro de T. En conclusión, en las CL las proteínas de la ME inducen cambios en la adhesión, morfología y secreción de T, in vitro.

238. Identificación de las células productoras de TNF-α en la adenohipófisis de rata. Susana Theas. Livia Lustig, Macarena Pampillo. Beatriz Duvilanski. Mercedes Lasaga. Adriana Seilicovich

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

El TNF-α es un mediador importante de la respuesta inmuno-neuroendócrina durante la infección, la inflamación y el estrés. Dado que previamente hemos demostrado que el TNF-α ejerce una acción inhibitoria sobre la proliferación celular adenohipofisaria y la liberación de prolactina de manera variable a lo largo del ciclo estral y dependiente de estrógenos, evaluamos la liberación basal de TNF-α desde cultivos monocapa de células adenohipofisarias provenientes de ratas en diferentes etapas del ciclo estral. La liberación de TNF-α (determinada por ELISA) desde células adenohipofisarias de ratas en proestro fue significativamente mayor que en la de ratas en diestro (proestro: 17.55 ± 2.66 pg/mL, estro: 12.82 ± 1.46, diestro: 10.36 ± 1.21; p<0.01; n=6-7). Con el objeto de identificar las células productoras de TNF-α, fueron realizadas técnicas de inmunofluorescencia de doble marcación, empleando anticuerpos anti TNF-α, ACTH, PRL, GH y S-100. Todos los tipos celulares estudiados expresaron TNF-α (corticotropos: 94%, lactotropos: 86%, somatotropos: 43% y folículo estrelladas: 29%). Estos resultados indican que el TNF-α liberado desde diversos tipos celulares podría actuar como un factor autocrino/paracrino en la regulación de la secreción de prolactina durante el ciclo estral.

239. Efectos estacionales de trasplantes hipofisarios sobre ritmos diarios de secreción de prolactina (PRL) y gonadotropinas en ratas. Rodolfo Cutrera, Ana Esquifino, David Pazo, Daniel Cardinali

Departamentos de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; Facultad de Bioquímica, Universidad Complutense, Madrid.

Con objeto de estudiar el efecto del trasplante hipofisario sobre los niveles circulantes de PRL y gonadotropinas en diferentes épocas del año, se transplantaron ratas recién nacidas en primavera u otoño, sacrificándose las 3 meses después en grupos de 6-8 animales cada 4 h durante 24 h. En ratas controles (operación simulada) se observó un ritmo diario en PRL, con acrofase a 21:53 - 00:54 h (cosinor), siendo mayor el valor medio y la amplitud en primavera en machos (F= 14.8 y 6.70, p<0.001; ANOVA) y en otoño en hembras (F= 8.46 y 3.66, p<0.01). En ratas transplantadas no se observaron cambios en la acrofase del ritmo de PRL. Los machos transplantados en primavera presentaron niveles de PRL más altos que los controles sólo en algunos puntos del ciclo diario, mientras que en los transplantados durante el otoño, no se observó tal aumento. Las hembras transplantadas en primavera mostraron niveles de PRL más altos que los controles en todos los horarios (p<0.01), mientras que las sacrificadas en otoño no presentaron diferencias. Se observó ritmo diario en LH sólo en machos controles, con acrofase a las 23:52 h en primavera y a las 00:24 h en otoño, siendo el valor medio y la amplitud significativamente más altos en otoño (F=10.1 y 4.93, p<0.0001). Los trasplantes hipofisarios suprimieron las variaciones diarias de LH con disminución de los niveles de LH y FSH en las dos estaciones examinadas (ANOVA factorial; p<0.05). Estos resultados indican que la hiperprolactinemia resultado de los trasplantes hipofisarios es dependiente de la época del año en la que se efectúa la cirugía.

240. Niveles de FSH, LH, PRL, GH, TSH, insulina y testosterona en ratas jóvenes y viejas luego de la inyección de adjuvante de Freund. Carlos Reyes Toso, Manuel Bonacho, Ana Esquifino, Patricia Castrillón, José Apphatie, Daniel Cardinali

Departamentos de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Bioquímica, Universidad Complutense, Madrid.

Se han estudiado poco los cambios producidos por la respuesta inmune sobre la secreción hormonal en el envejecimiento. En el presente trabajo se examinó la modificación de ritmos circadianos hormonales luego de la inyección de adyuvante de Freund (AF). Se emplearon ratas Wistar macho de 2 y 18 meses de edad, tratadas con AF o su vehículo (V) y sacrificadas 18 días más tarde cada 4 h durante 24 h (n= 5-7/grupo). Se recogió plasma para la determinación por RIA de FSH, LH, GH, TSH, PRL, insulina y testosterona. En ratas jóvenes tratadas con V se observaron máximos en LH y testosterona a las 01:00 y 17:00 h (F= 6.71, p< 0.0005, ANOVA) los que desaparecieron luego de inyectar AF. Para TSH, al máximo de las 1300 h se sumó un segundo pico a las 0100 h luego de AF (F= 2.94, p= 0.03). Los niveles de PRL en ratas viejas tratadas con AF o con V mostraron máximos a las 13:00-17:00 h al igual que los de insulina con AF (F= 2.34 p< 0.04). A las 2100 h se registraron picos de PRL en las ratas viejas con AF, y de insulina con AF o V (3.53 p< 0.0005). En ratas viejas no se observaron ritmos diarios en LH, TSH y testosterona, detectándose mayores niveles (pg/ml) de PRL (2032 ± 231 vs 700 ± 98) y menores de GH (3245 ± 536 vs 1056 ± 215), TSH (512±76 vs 278 ± 34), FSH (5523 ± 654 vs 3110 ± 456) y testosterona (3245 ± 543 vs 1432 ± 233) (p< 0.01), sin alteraciones apreciables luego de AF. Estos resultados sugieren que la inmunización altera los mecanismos circadianos de control neuroendocrino en forma diferencial con la edad.

241. Papel del óxido nítrico endógeno sobre la liberación de prolactina durante el ciclo estral. Miguel Velardez, María del Carmen Díaz, Mercedes Lasaga, Hernán Otero, Beatriz Duvilanski

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

La síntesis de óxido nítrico (NO) está regulada diferencialmente por el estado gonadal. En este trabajo se estudió el papel del NO endógeno sobre la liberación de prolactina durante el ciclo estral. Las adenohipófisis de ratas hembras se incubaron en presencia de inhibidores de la NO sintasa, L-NAME y Aminoguanidina, AG. L-NAME (0.5 mM) no afectó la liberación de prolactina en ratas en diestro (Diestro: 1.33 ± 0.17 mg/mg proteína, L-NAME: 1.32 ± 0.18, n=6), pero aumentó significativamente la liberación de prolactina en ratas en proestro y estro (Proestro: 2.05 ± 0.10, L-NAME: 2.90 ± 0.11, n=6, p<0.01; Estro: 1.58 ± 0.24, L-NAME: 2.70 ± 0.12, n=6, p<0.01). Se obtuvieron resultados similares con AG. Además, la AG (0.5 mM) no modificó la liberación de prolactina en ratas ovariectomizadas (OVX) pero la aumentó en ratas estrogenizadas crónicamente (OVX-E2) (OVX: 1.59 ± 0.18, AG: 1.45 ± 0.10; OVX-E2: 4.53 ± 0.40, AG: 7.38 ± 0.87, n=8, p<0.01). El NO exógeno (nitroprusiato de sodio, NP 0.5 mM) no afectó la liberación de prolactina en ratas OVX-E2 (OVX-E2: 4.35 ± 0.41, OVX-E2 + NP: 4.93 ± 0.44, n=8). Estos resultados indican que el NO endógeno estaría involucrado en el control esteroideo sobre la secreción de prolactina desde la adenohipófisis y sugieren que la concentración del NO liberado experimentaría cambios durante el ciclo estral y/o existiría una modificación de la sensibilidad de las células al NO.

242. Efecto del óxido nítrico (NO) sobre el metabolismo del ácido araquidónico en adenohipófisis de rata. Miguel Velardez*, Ana Franchi†, Beatriz Duvilanski*

* *Centro de Investigaciones en Reproducción. Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.* † *Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos-CONICET, Buenos Aires.*

Diversos mecanismos intracelulares estarían involucrados en el efecto inhibitorio del NO sobre la secreción de prolactina. Previamente demostramos que el NO disminuye la concentración intracelular de calcio y cAMP en adenohipófisis. El ácido araquidónico (AA) y sus derivados de la vía de la lipooxigenasa (LOX) estimulan la secreción de prolactina. En el presente trabajo estudiamos el efecto del NO sobre la actividad de la 5-LOX y la ciclooxigenasa (COX) por el método de radioconversión de [³H]-

araquidonato en los productos de cada una de estas enzimas, determinados por cromatografía en capa delgada. El nitroprusiato de sodio (NP), dador de NO, disminuyó la liberación de prolactina y la concentración de 5-HETE, producto de la 5-LOX (Control: 565.0 ± 72.8 cpm/mg proteína, NP 0.25mM: 520.0 ± 26.8, NP 0.5mM: 372.6 ± 31.4*, NP 1mM: 384.3 ± 54.1*, n=6 *p<0.05 vs Control), mientras que la oxihemoglobina (Hb), secuestrador del NO liberado, revirtió el efecto de NP (Hb 10⁻⁶M: 584.5 ± 37.5, Hb + NP 0.5mM: 558.7 ± 50.3). El NP no afectó la actividad de la COX. Sin embargo, L-NAME, inhibidor de la óxido nítrico sintasa, disminuyó la producción de derivados de la COX (PGE2: Control: 10536.7 ± 1333.6, NP 0.5mM: 11150.6 ± 530.5, L-NAME: 5370.2 ± 766.3*, n=6 *p<0.05 vs Control), sin afectar la actividad de la 5-LOX. La Hb produjo un efecto similar. Nuestros resultados indican que el NO afecta la actividad de las enzimas que intervienen en el metabolismo del AA en adenohipófisis. La disminución en la producción de 5-HETE inducida por NP sugiere que esta vía metabólica también participaría en el efecto inhibitorio del NO sobre la secreción de prolactina.

243. El neuroesteroide Allopregnenolona altera la receptividad sexual de la rata. Laconi, Myriam, Casteller Guillermo & Cabrera, Ricardo

Laboratorio de Investigaciones Cerebrales (CONICET) y Facultad de Ciencias Médicas Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza.

Allopregnenolona (All) y Pregnenolona (Pe) son neuroesteroides con potentes acciones sobre el sistema nervioso central (SNC), modulando sistemas de neurotransmisión ligados a canales iónicos como el GABAérgico. Evidencias indican que el ciclo estral y algunos cambios en la conducta sexual de la rata estarían asociados a la acción de los neuroesteroides en el SNC. All suprime tanto la liberación de GnRH como también la ovulación. El objetivo del trabajo fue evaluar las modificaciones en la conducta sexual de la rata posterior a la inyección intracerebroventricular (icv) de All (6µM) (n=8), Pe (6 µM) (n=8), vehículo (Krebs) (n=8) y Bicuculina (Bi 9,8 µM) (n=8). Se utilizaron hembras adultas (200-250 gr) en estro (E) y ovariectomizadas impregnadas con estrógeno (25 µg/rata sc) y progesterona (1mg/rata sc) (OVXi). Los datos fueron expresados como índice de receptividad (IR= lordosis/monta) tras 15 montas efectivas y analizados estadísticamente con ANOVA I y Student-Newman-Keuls. Treinta minutos después de la inyección icv de las drogas detalladas anteriormente, se evaluó la receptividad de las hembras. All indujo una disminución significativa del IR respecto a los animales inyectados con vehículo (IR=0,33 vs. 0,95 p<0,05 en E; e IR=0,40 vs. 0,98 p<0,05 en OVXi). Bi inyectada previamente a All bloqueó el efecto de All (IR= 0,98 vs 0,98). Pregnenolona no modificó el IR respecto de los animales inyectados con vehículo (IR= 0,97 vs 0,98 en OVXi). En conclusión, los neuroesteroides a - sustituidos como All modificarían la receptividad sexual de la hembra por mecanismos no genómicos que involucrarían la modulación del receptor GABA_A, mientras que los b -sustituidos como Pe no modificarían este patrón conductual. Asimismo, esto nos indicaría una interacción entre mecanismos genómicos y no genómicos entre los esteroides ováricos endógenos y los neuroesteroides.

244. Rol modulador neuroendócrino de Allopregnenolona en la liberación de la Hormona Luteinizante. Griselda Moreno, Claudia Bregonzio, Ricardo Cabrera

Laboratorio de Investigaciones Cerebrales. (CONICET) Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza.

La allopregnenolona (All) es un neuroesteroide sintetizado tanto en el sistema nervioso central como en el periférico. Actúa a nivel del receptor GABA_A potenciando la neurotransmisión GABAérgica. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la acción de All sobre los mecanismos regulatorios GABAérgicos centrales de la liberación de LH. Se utilizaron ratas hembras

ovariectomizadas impregnadas con estrógeno (25ug) s.c. y progesterona (1mg/rata) s.c., a las cuales se les implantó unilateralmente una cánula de acero inoxidable en ventrículo lateral y una de silastic en la vena yugular derecha para la extracción seriada de sangre a intervalos de una hora, desde las 16 hs. hasta las 22 hs. inclusive. Todas las drogas fueron administradas en un volumen final de 1,2µl i.c.v. a las 15 hs. según el protocolo experimental: All 100 nM o su vehículo, Bicuculina (Bic), Bic + All, Phaclofen (Pha) o Pha+All. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA 1 seguido de test de Bonferroni. All produjo una inhibición en la liberación de LH ($p < 0.01$) a las 19 hs. y ($p < 0.05$) a las 20 hs. Bic administrada previamente a All revirtió el efecto inhibitorio observado. Pha tuvo un efecto inhibitorio per se sobre la liberación de LH ($p < 0.05$) a las 19 hs y ($p < 0.01$) a las 20 hs. pero no modificó el efecto de All. Concluimos que All posee un perfil de acción similar a otros agonistas GABA, ejerciendo un rol modulador negativo sobre la liberación de LH activando únicamente el sitio GABA_A mientras que no modularía GABA_B. Asimismo este efecto podría explicar una acción diferencial sobre las neuronas GnRH hipotalámicas tanto de los agonistas GABA_A y GABA_B.

245. Asociación del efecto ansiolítico de allopregnanolona con cambios hormonales cíclicos en la rata. Laconi, Myriam & Cabrera, Ricardo

Laboratorio de Investigaciones Cerebrales (CONICET), Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza.

Los neuroesteroides son moléculas derivadas de las hormonas esteroideas, sintetizadas en el sistema nervioso central. Uno de ellos, Allopregnanolona (All), ha demostrado interactuar con el sistema GABAérgico. Objetivo: evaluar el efecto All en ratas hembras bajo diferentes condiciones hormonales ante una situación ansiogénica. Se utilizaron ratas adultas en ciclo y ovariectomizadas (OVX). Los grupos experimentales fueron: diestro₁(D₁), estro(E), OVX impregnadas (estrógeno, progesterona) y OVX sin impregnar. All (6mM), solución Krebs (KRB) y Bicuculina (Bi) fueron administradas intracerebro ventricular. Se evaluó ansiedad (test de encrucijada elevada (Plus maze) y actividad locomotora (open field). Se cuantificó el tiempo de permanencia en el brazo abierto y cerrado (TPBA-TPBC), tiempo de permanencia en el extremo abierto distal (TPEAD), número de entradas en el brazo abierto y cerrado (NEBA-NEBC). La actividad locomotora no se modificó con All. All indujo un aumento significativo en TPBA y TPEAD en E (t test $P = 0,007$) y OVX ($P = 0,002$) respecto de los controles. Bi per se no modificó el efecto ansiolítico de All, pero en combinación con All a dosis crecientes este efecto fue removido. Los resultados sugieren que el efecto de All está influenciado por el estatus hormonal del animal; que All alteraría patrones comportamentales inducidos por situaciones ansiogénicas modulando a nivel del sistema GABAérgico y puntualizaría además, el rol de las hormonas ováricas en la respuesta orgánica al stress.

RENAL B

246. La viscosidad del fluido en los capilares peritubulares modula la tasa de acidificación en túbulo contorneado proximal mediante liberación de óxido nítrico y ATP. Paula Díaz Sylvester, Myriam MacLaughlin, Carlos Amorena

Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Universidad de Buenos Aires. Escuela de Ciencia y Tecnología. UNSAM Universidad Nacional de San Martín.

En un trabajo previo observamos que la perfusión de capilares peritubulares (CP) con Bradiquinina y Carbamilcolina induce un aumento en el flujo de H⁺ (J_{H⁺}) en túbulo contorneado proximal (TCP) vía liberación de óxido nítrico (NO) desde el endotelio. A nivel sistémico, el shear stress (SS) es un fuerte agonista para la liberación de NO mediante la activación de receptores de membrana, incluidos los purinérgicos. El grado de SS es proporcional a la viscosidad (η) del fluido. En este trabajo evaluamos el efecto

de cambios del SS en los CP sobre la cinética de acidificación del TCP. **Métodos:** Realizamos experimentos de micropuntura con perfusión luminal y peritubular simultáneas. Con un microelectrodo medimos cambios en el pH de una gota de Ringer HNaPO₄ 20mM (pH_{iso} 7,4) en el lumen del TCP. El SS se incrementó agregando Dextrán (P.M. 300-400.000) o Percoll a la solución perfusora del CP (Ringer HNaPO₄ 20 mM, pH 7,4) aumentando en un 30% los valores controles de h. Evaluamos el efecto del antagonista de NO N ω -Nitro-L-Arginina (N ω) (1mM) y de antagonistas de purinoreceptores Suramin (0,1 mM) y Reactive Blue 2 (RB2) (30µM) en soluciones de alta η , y el efecto de ATP (0,1 mM) a η normal. **Resultados:** Valores en nmol \times cm⁻² \times seg⁻¹ de J_{H⁺} = (HPO₄³⁻ - HPO₄²⁻) \times k \times r/2: Control = 0,970 \pm 0,049; Percoll = 1,655 \pm 0,208*; Dextran = 2,208 \pm 0,208*; Dex.+N ω = 0,427 \pm 0,068; ATP = 1,746 \pm 0,132*; ATP+N ω = 0,893 \pm 0,044; Dex.+RB2 = 0,855 \pm 0,096; Dex.+Suramin = 1,028 \pm 0,046 (* $p < 0.05$ vs control). **Conclusiones:** El SS en el CP modularía la tasa de acidificación en TCP vía liberación de NO y por activación de receptores purinérgicos. Esto afectaría la reabsorción de Na⁺ y agua contribuyendo al mantenimiento del balance glomérulo-tubular.

247. Participación de la Dopamina en los efectos de la L-arginina sobre la función renal. María Costa, Marcela Marchetti, Analía Loria, Ana Balaszczuk, Cristina Arranz

Cátedra de Fisiología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Instituto de Química y Metabolismo de Fármacos. CONICET

En el presente trabajo se estudió la participación de la dopamina sobre los mecanismos involucrados en el efecto renal de la L-arginina (L-arg) sobre la excreción de agua y sodio. Se analizaron: la presión arterial media (PAM, mmHg), la diuresis (D:ul/min/ 100g) y la natriuresis (N:uEq/min/100g) luego de la administración de L-arg (250 mg/Kg, iv) en animales tratados con haloperidol (Halo: 3mg/Kg ip). Se trabajó con ratas Wistar machos anestesiadas con etil-uretano (1g/Kg peso corporal). Resultados: A) Control (n=10): PAM=83 \pm 3; D=4.15 \pm 0.56; N=0.22 \pm 0.03; B) L-arg (n=8): PAM=62 \pm 3*+; D=17.15 \pm 2.11*+; N=0.94 \pm 0.13*+; C) Halo (n=6) PAM=82 \pm 8; D=4.78 \pm 0.94; N= 0.18 \pm 0.03; D) Halo + L-arg (n=6): PAM=64 \pm 5*+; D=6.82 \pm 0.61*#*+; N 0.43 \pm 0.04*#*+. * $p < 0.01$, vs Control (A); # $p < 0.01$ vs L-arg (B); + * $p < 0.01$ vs Halo (C). El tratamiento con haloperidol no modificó el efecto hipotensor de la L-arginina. Por el contrario la administración del antagonista dopaminérgico disminuyó significativamente el aumento de la diuresis y natriuresis inducido por la L-arginina. La dopamina renal participaría de la respuesta diurética y natriurética de la L-arginina y dicho efecto no estaría relacionado con cambios hemodinámicos.

248. El Factor Natriurético Atrial (ANF) y la Angiotensina II (AngII) modifican la captación de dopamina (DA) a nivel renal, sin alterar su secreción. Alicia Correa, Pablo Shvartz, Marcelo Choi, Belisario Fernández

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

Los bloqueantes de la DA inhiben parte de los efectos diuréticos y natriuréticos del ANF. Observamos que el ANF (99-126) (Medicina, 57,16,1997) incrementa la captación de 3H-DA en riñón, sin alterar la incorporación del precursor L-Dopa ni la secreción de DA. Estudiamos, en cortes de corteza renal de ratas el tipo de captación afectada y el segundo mensajero y receptor involucrados. La hidrocortisona (HC) 100 nM y el azul de metileno (AM) 10 uM inhibieron el estímulo de la captación de DA (d.p.m/g. \times 10⁻⁵) inducida por ANF 100 nM (ANF 11,19 \pm 1,43(9) vs HC 2.64 \pm 0.16(8)*; vs HC-ANF 2,20 \pm 0.18(9)* y vs AM-ANF 7,14 \pm 0.54.(7)*. La ANG II 100 nM redujo la captación de DA (Control 11,18 \pm 0,47 (9) vs ANG II 4,96 \pm 0,28*(11).*: $p < 0.05$). Con KCl 25mM no se indujo la secreción de DA (1-90 min), la que tampoco fue afectada adicionando ANF 100 nM o ANG II 100nM o el inhibidor de la EP 24-11 thiorfan 10 nM. Se concluye que parte de los efectos renales del ANF pueden deberse al estímulo del

transporte de DA. Este posee características de captación extraneuronal y se estimula a través de receptores biológicos tipo A y el GMPc como segundo mensajero. No se observó un mecanismo excitotóxico de secreción de DA, siendo ésta inalterada por la ANG II y el ANF. La ANG II produjo efectos opuestos al ANF, inhibiendo la captación de DA, sugiriendo que ésta puede mediar parte de sus efectos antinatriuréticos.

249. Acción diferencial de glucocorticoides y de mineralocorticoides sobre el intercambiador Na⁺/H⁺ de túbulo proximal. Pilar Igarreta, Marisa Zalocchi, Juan Calvo, Cristina Damasco

Programa de Regulación Hormonal y Metabólica, Universidad de Buenos Aires.

En trabajos previos, observamos que la adrenalectomía (ADX) reduce la acidificación del túbulo proximal (TP) y que la administración de corticosterona (B) o de aldosterona (aldo) revierte este defecto. Dado que no hay receptores para mineralocorticoides (MC) en el TP, decidimos estudiar comparativamente los mecanismos de acción de aldo y B por fluorimetría, utilizando vesículas de ribete en cepillo, y la expresión de NHE3 por Western-blot en ratas sham, ADX y ADX inyectadas con B o con aldo. Resultados: Vmax: ADX 30800 ± 1424, sham 41700 ± 657*, ADX + aldo 42344 ± 3044* Unidades de Fluorescencia/min (*p < 0,01 versus ADX). La expresión de NHE3 disminuye un 58% en el grupo ADX comparado con sham. El reemplazo con B, pero no con aldo aumenta la expresión en un 162% comparado con ADX. Conclusiones: Las ratas ADX tienen una disminución tanto de la Vmax como de la expresión de NHE3. El incremento en la Vmax inducido por glucocorticoides (GC) y MC estaría mediado por distintos mecanismos: los GC incrementarían la expresión de NHE3 a través de sus receptores intracelulares, mientras que aldo incrementaría la actividad del intercambiador mediante otro mecanismo que podría ser no-genómico e involucrar receptores de membrana.

250. Lípidos y esclerosis glomerular en ratas nefróticas. Jorge Toblli, Graciela DeRosa, Margarita Angerosa, Gabriel Cao, Cristina Nyberg

Laboratorio de Medicina Experimental. Hospital Alemán & Departamento de Patología, Hospital de Clínicas, Buenos Aires.

El objetivo del presente estudio fue relacionar el grado de esclerosis glomerular (EG) con niveles de lípidos en suero de ratas con síndrome nefrótico (SN) por adriamicina (AD). Machos SD adultos. G1 (n=15) Control; G2 (n=15) SN. El G2 recibió AD 7,5mg/Kg, dosis única IV, y G1 equivalente volumen de sol. salina isotónica. Duración del estudio 8 semanas. Ambos Gs con alimento standard y agua común, "ad libitum". Se determinó Presión arterial (TAS) por "tail cuff", Proteinuria (Up), clearance cr. (Clcr), colesterolemia (Col), trigliceridemia (TG) y se analizó el grado de EG mediante score de Raij y la presencia de grasa (oil red) en lesiones glomerulares. Resultados 8va. Semana (media ± DS): 1) TAS (mmHg) G1: 120,5 ± 1, G2: 138,8 ± 3,5 (p<0,01); 2) Clcr (ml/min) G1: 1,2 ± 0,06, G2: 0,97 ± 0,07 (p<0,01); 3) Up (mg/día) G1: 2,5 ± 1,4, G2: 344,9 ± 104,5 (p<0,01); 4) Col (mg/dl) G1: 38,4 ± 9,2, G2: 332,2 ± 98,4 (p<0,01); 5) TG (mg/dl) G1: 30 ± 7,4, G2: 320,4 ± 80,2 (p<0,01); 6) % de glomerulos con EG, G1: 2 ± 0,2, G2: 97,7 ± 2; 7) EG (score) G1: 1,28 ± 0,8, G2: 219,5 ± 40,7. Correlaciones (Spearman) (p<0,05) : 1) EG-Col. (r=0,875); 2) EG-TG (r=0,8429); 3) EG-Clcr. (r=-0,5826); 4) EG-Up (r=0,7964). Se destacó la presencia de grasa intra y extracelular en el 100% de los glomérulos con EG. Estos resultados sugieren la contribución de la dislipidemia en la patogenia y progresión de la EG en este modelo.

251. Riñón e hipertensión. Influencia del tiempo de uninefrectomía y sexo. Elisabet Oddo, Fernando Ibarra, Leonardo Paz, Jorge Toledo, Elvira Arrizurieta

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Resultados previos han mostrado la existencia de respuestas diferentes en ratas macho (M) y hembra (H) a la uninefrectomía (Unx) precoz y tardía en lo que respecta a crecimiento renal compensador, regulación de la presión arterial y producción de kalikreína renal. Nos interesó estudiar, a los 360 días de vida, en ratas Wistar M y H, controles (C) y con unx precoz (a los 5 días de vida, GA) y tardía (a los 90 días de vida, GB), los cambios hemodinámicos y morfológicos que acompañan a los hallazgos mencionados. El filtrado glomerular, ml/min/g riñón, para el GA en M y H, C y unx fue 0.83 ± 0.09 (MC), 0.76 ± 0.06 (MuNX), 0.86 ± 0.12 (HC) y 0.51 ± 0.07 (HuNX) y para el GB: 0.83 ± 0.09 (MC), 0.70 ± 0.04 (MuNX), 0.86 ± 0.12 (HC) y 0.90 ± 0.17 (HuNX). HuNX de GA y M unx de GB no alcanzaron el grado de compensación esperado p<0.02 y 0.01, respectivamente, como lo hicieron MuNX y HuNX de los grupos A y B. Asimismo, los primeros desarrollaron hipertensión, 135 ± 3.5 vs 122 ± 4.6 mmHg (p<0.05), en mayor proporción en M que en H (80% vs 66%). Las alteraciones morfológicas mostraron en los animales hipertensos un polo vascular prominente, atrofia tubular, fibrosis intersticial, abundantes cilindros hialinos y calcificaciones. La falta de compensación funcional y el desarrollo de hipertensión podría estar vinculado con el sexo de los animales y el tiempo de la unx.

252. Anticuerpos a-fibronectina (a-Fn) en enfermedad renal. Nidia Abraham, Alicia Toffi, María Svetaz, Mariela Bearzotti, Ester Saball

Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario.

Los cambios conformacionales de la fibronectina, responsables de exponer determinantes crípticos y dar lugar a la formación de autoanticuerpos (AuAcs), son posibles en las condiciones alteradas del riñón enfermo. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la incidencia de anticuerpos a-Fn en 56 muestras de pacientes renales en relación con anticuerpos dirigidos a histonas, cuyas propiedades antigénicas también pueden cambiar y ANCA, asociados a vasculitis renal. El título de a-Fn y a-histonas se determinó por ELISA directo en placas sensibilizadas con Fn plasmática humana purificada en el laboratorio e histona comercial. Se consideraron positivas las muestras cuyos valores superaran la media +3DS de 40 muestras normales, a-Fn 0.159 y a-his 0.428. ANCA se determinó por IFI. El 46.4% de las muestras resultó a-Fn positiva. ANOVA: se aplicó el test de Kruskal Wallis efectuando comparaciones múltiples a libre distribución basadas en la suma de rangos. a-Fn en ANCA(+)a-his(+) (n=17, mediana 0.481, ri 0.252-0.844) resultó significativamente mayor que en ANCA(-)a-his(-) (n=16, mediana 0.113, ri 0.051-0.180), ANCA(-)a-his(+) (n=5, mediana 0.073, ri 0.063-0.097) y ANCA(+)a-his(-) (n=18, mediana: 0.127, ri 0.059-0.180), que no difirieron significativamente entre sí (p<0.01). Los resultados muestran una asociación entre estos AuAcs y sugieren el interés de esta combinación a los fines de aumentar la utilidad diagnóstica de los test serológicos en enfermedad renal, particularmente glomerulonefritis.

253. Inmunoglobulina G (IgG) induce disfunción vascular renal en ratas con fallo renal crónico. Cecilia Sayago, Federico Rey, Néstor García, y Luis Juncos

Instituto Privado de Investigaciones Médicas. Departamento de Fisiología Renal, Buenos Aires.

La terapia con IgG i.v. se usa para tratar una variedad de enfermedades sistémicas. Sin embargo, se ha reportado que ésta causa fallo renal agudo si existe daño renal previo. Por ello investigamos si la administración aguda de IgG i.v. altera *per se* la función renal en ratas con función renal intacta (Sham) y con fallo renal crónico (IRC, Cr_{pl}=0.9 ± 0.1mg%, p<0.01 vs Sham). Ratas Sham (n=8) y con IRC (n=6) recibieron IgG i.v. en dosis de 3g% durante 5 minutos. Se determinó: flujo plasmático renal (FPR), tensión arterial (TA), filtrado glomerular (FG) y excreción urinaria de sodio (U_{Na}V). La reactividad vascular renal fue evaluada en base al descenso del FPR inducido por Ang II (0.1 ml 10

⁶M) antes y después de administrar IgG. En Sham e IRC el aumento de TA inducido por Ang II fue similar antes y después de IgG. En Sham e IRC IgG no modificó el FPR basal. La Ang II disminuyó el FPR $61 \pm 10\%$ antes de IgG y $54 \pm 12\%$ después de IgG (NS). Sin embargo, en ratas con IRC, la Ang II indujo una constricción de $51 \pm 9\%$ antes y $41 \pm 7\%$ después de IgG ($p=0.05$). Para descartar un efecto inducido por el estabilizante de la IgG, investigamos el efecto de la sucrosa sobre la reactividad vascular en IRC. En esta situación, la caída de FPR inducida por Ang II, la TA y el FG no fueron alterados por la sucrosa. Como era de esperar IgG y sucrosa aumentaron $U_{Na}V$. **Conclusión:** la infusión de IgG en ratas con IRC causa una disfunción vascular que se manifiesta por una respuesta anormal a la Ang II.

254. Acidificación tubular proximal en ratas seniles. Myriam Mac Laughlin, Cristina Damasco, Pilar Igarreta, Carlos Amorena

Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Facultad de Medicina y PRHOM, CONICET. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

La capacidad de acidificación urinaria disminuye con la edad. En el presente trabajo estudiamos la acidificación del túbulo proximal (TP) en ratas seniles (S) de 24 meses y en controles (C) de 3 meses. Medimos: 1) la cinética del intercambiador Na^+H^+ , mediante fluorimetría, en vesículas de ribete en cepillo de TP, 2) la expresión de la isoforma NHE3 del intercambiador por inmunoblotting y 3) la cinética de acidificación, mediante mecropunción de TP, con perfusión luminal y peritubular simultánea con Ringer PO_4H_2 . Resultados: en las ratas seniles se observó: a) disminución significativa en la V_{max} del intercambiador Na^+H^+ (S: 4977 ± 264 ($n=3$) y C: 27673 ± 2769 ($n=4$) unidades fluorimétricas/min/mg proteína, $p<0.01$, sin que se afecte el Km. b) disminución del 90% en la expresión de NHE3, c) disminución en la constante de velocidad de acidificación: S: $0.12 \pm 0.008s^{-1}$ ($n=21$) y C: $0.18 \pm 0.02 s^{-1}$ ($n=15$), $p<0.01$. El pH de estado estacionario (ss) y la $[PO_4H_2]_{ss}$ no se modificaron. **Conclusión:** existe una disminución en la capacidad de acidificación urinaria en el TP de ratas seniles. Esta puede ser atribuida, en parte, a una caída en la actividad del intercambiador Na^+H^+ . La acentuada disminución de la actividad del intercambiador evidenciada en los experimentos con vesículas, estaría parcialmente compensada en el TP intacto.

TUMORES A

255. Proteínas reguladoras del ciclo celular en tumores del SNC. Irene Orlow, Gloria Machiavelli, Alvaro Campero, Conrado Rivadeneira, Armando Basso, Carlos Córdoba-Cardó, Irene Szijan

Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica y Neurocirugía, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires. Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre, New York, USA.

Las proteínas estimuladoras e inhibidoras del ciclo celular regulan la progresión de la célula hacia la mitosis. El primer paso está dado por proteínas de la ruta del retinoblastoma: ciclina D1 (cic D1), quinasas ciclino-dependientes (Cdk2-4), inhibidor de quinasas p16 y el sustrato, proteína de retinoblastoma (pRB). La alteración en alguna de estas proteínas puede llevar a un aumento en la proliferación celular y a la formación de tumores. Se estudió la expresión de estas proteínas reguladoras en 21 tumores del SNC, 7 malignos y 14 benignos, por medio de inmunohistoquímica, utilizando anticuerpos monoclonales y el complejo avidina-biotina. Normalmente el gen RB se expresa a niveles medios y la cic D1 y Cdk4 son indetectables. El análisis de tumores mostró: Ausencia de pRBtotal en 2 tumores malignos y 1 benigno; pRB presente pero hiperfosforilada en 4 tumores benignos; Bajos niveles de pRB activa en 11 tumores, 5 malignos y 6 benignos; Altos niveles de pRB activa en 3 tumores benignos; Cic D1 presente en

3 tumores benignos, 2 con bajo nivel de pRB hipofosforilada; Cdk4 resultó positiva en los 3 tumores cic (+) y en 2 más 1 de ellos maligno; El índice de proliferación fue elevado en pocos tumores tanto malignos como benignos. **Conclusión:** La expresión de pRB y su estado de fosforilación es normal en la mayoría de los tumores del SNC, así como también la de cic D1 y Cdk4. Se vió ausencia de pRB activa en un 30% de los tumores (malignos y benignos) y alta expresión de pRB activa solo en tumores benignos (21%).

256. Determinación del oncogen c-erbB-2 (HER-2/neu) en cáncer de mama. Severino Michelin¹, José Mayo², Silvia Mancini de Gentile³, Juan Dillon³, Eliseo Gonzalez⁴

¹ Autoridad Regulatoria Nuclear; ² Comisión Nacional de Energía Atómica; ³ Hospital de Agudos Dr. José Ramos Mejía; ⁴ Instituto de Enfermedades Neurometabólicas, Buenos Aires.

Introducción: El cáncer de mama es el más frecuente en las mujeres y en nuestro país representa la primer causa de muerte por cáncer. Se ha demostrado que el 20 a 30 % de estas neoplasias poseen el oncogen c-erbB-2 activado, lo cual es considerado como un indicador de mal pronóstico. El oncogen c-erbB-2 codifica un receptor de membrana. Su bloqueo por un anticuerpo monoclonal, se ha comenzado a utilizar con fines terapéuticos en pacientes con carcinomas avanzados y con metástasis que expresan este oncogen. **Objetivo:** determinar el nivel de amplificación del oncogen c-erbB-2 en pacientes con cáncer de mama por métodos radioactivos. **Metodología:** Se utilizaron las técnicas de Southern, y Dot blot. La detección del oncogen se realizó con una sonda (pKX 044) marcada con ³²P. **Resultados y conclusiones:** Se determinó el nivel de amplificación del oncogen c-erbB-2 en 25 tumores observándose amplificación en 3 carcinomas ductales infiltrantes y 2 carcinomas lobulillares infiltrantes, todos con ganglios positivos (20% de los casos). La metodología empleada es una alternativa del método inmunohistoquímico que permite detectar y cuantificar el grado de amplificación de este oncogen. Si bien el número de casos estudiados es reducido, el porcentaje de casos positivos en nuestro análisis, estaría dentro de los resultados internacionales.

257. Cronoradioterapia en pacientes con cáncer de cuello uterino estadios IIb y IIIb. Lucas Colombo, Martín Edreira, Sergio Giani, Dora Loria, Berta Roth, Enrico Carusso, Diana De Dios, Hugo Porcella

Área Investigación, Servicios de Radioterapia y de Ginecología. Instituto de Oncología A.H. Roffo, Universidad de Buenos Aires.

Introducción: Existen variaciones circadianas (a lo largo del día y la noche) en el número de mitosis, apoptosis, flujo sanguíneo, metabolismo, etc, de muchos tejidos normales así como tumorales. En esas diferencias se apoya la Cronofarmacología tumoral, que consiste en administrar mayores dosis de quimioterápicos a la hora del día que más células tumorales y menos células de tejidos normales (P. Ej: M.Osea) son sensibles. Variaciones circadianas en sensibilidad a radiaciones se describieron para tejidos normales (P. Ej: intestino de ratón). **Objetivo:** Analizar retrospectivamente si la hora del día de aplicación de la radioterapia como único tratamiento influyó sobre la evolución de pacientes con cáncer de cuello uterino estadios IIb y IIIb. **Mat y Met:** 199 pacientes (103 IIb y 96 IIIb) concurren para recibir radioterapia durante 23 días hábiles seguidos. El horario de irradiación fue fijo para cada paciente. Se presentan los datos subdividiendo a los pacientes dentro de cada estadio, en 3 grupos de acuerdo al horario de irradiación: a) 8 a 12 hs, b) 13 a 16 hs y c) 17 a 23 hs. La distribución de los pacientes en los 3 grupos fue homogénea. **Resultados:** No hubo diferencias entre los 3 grupos horarios, dentro de cada estadio, en los parámetros buscados: 1) período libre de enfermedad, 2) sobrevida, 3) complicaciones actínicas, 4) frecuencia de recidivas y 5) metástasis. **Conclusión:** Podemos concluir que la hora del día a la cual el tumor recibió el

tratamiento radioterápico no influyó en ninguno de los parámetros buscados (los clínicamente más importantes). Sin embargo ello no descarta que para otros tumores, estadios, etc, la Cronoradioterapia pueda brindar resultados positivos.

258. Niveles de actividad plasmática de MMP-9 durante el tratamiento primario y adyuvante en pacientes con cáncer de mama. Stella Ranuncolo, Eduardo Armanasco, Carlos Cresta, Elisa Bal de Kier Joffé, Lydia Puricelli

Area Investigación y Patología Mamaria del Instituto de Oncología Angel H. Roffo, Universidad de Buenos Aires.

Las metaloproteasas (MMPs) se asocian con procesos de invasión y metástasis. Previamente demostramos que pacientes con cáncer de mama presentan valores significativamente elevados de actividad MMP-9 circulante. Es nuestro objetivo analizar si la actividad de MMP-9 plasmática es de utilidad en el monitoreo de la respuesta al tratamiento primario (cirugía o neoadyuvancia + cirugía) y a la terapia adyuvante (radio, hormono y/o quimioterapia). La actividad MMP-9 se determinó mediante zimografía cuantitativa en la fracción euglobulina de 40 pacientes con cáncer de mama (7 en E1, 27 en EII y 6 en EIII), durante un período de hasta 30 meses. Las muestras se obtuvieron en el momento del diagnóstico (M1) (pacientes vírgenes de tratamiento), un mes post-cirugía (M2) y luego cada tres meses (M3 y siguientes). En el 82% de las pacientes se observó que la actividad de MMP-9 de la M2 disminuye hasta 10 veces respecto del valor inicial (M1). 34 pacientes respondieron al tratamiento primario y adyuvante y no presentaron evidencias de enfermedad durante el período de seguimiento. Los niveles de actividad MMP-9 de estas pacientes, en las muestras M3 y siguientes, se mantuvieron o continuaron descendiendo independientemente del tratamiento implementado. En cambio, en 6 pacientes que progresaron (4 en EIII y 2 en EII) se observó un aumento significativo de la actividad MMP-9 circulante, que se anticipó entre 1 y 8 meses al diagnóstico clínico de la diseminación tumoral. Los resultados sugieren que la actividad MMP-9 plasmática sería un marcador de utilidad para evaluar la respuesta al tratamiento implementado en pacientes con cáncer de mama.

259. Cuantificación de N-CAM en suero humano. Aumento de los niveles en pacientes con tumores cerebrales. Laura Todaro, Lydia Puricelli, M. Guadalupe Pallota, José Lastiri, M. Emilia Lincuez, Elisa Bal de Kier Joffé, Mirta Varela, Eugenia S. de Lustig

Instituto de Oncología A.H. Roffo y Hospital Italiano, Buenos Aires.

La N-CAM es una glicoproteína de membrana que se expresa en células que derivan del neuroectodermo y del mesénquima y en tumores que derivan de estos tejidos. Promueve la adhesión neurona-neurona y se la asocia a la estabilización de las uniones sinápticas y a la fijación del aprendizaje. N-CAM puede también presentarse en forma soluble. El objetivo de este trabajo fue cuantificar la N-CAM soluble en la población normal y ver si sus niveles se modifican en los procesos proliferativos, como en los tumores cerebrales. Para ello muestras de suero de 29 controles (12 hombres y 14 mujeres; Edad: Md=45 (21-84)), y 11 pacientes con tumores cerebrales (6 hombres y 5 mujeres, Edad: Md=69 (38-77) fueron sometidas a SDS-PAGE y transferidas a membrana de nylon. Estas se incubaron con un anticuerpo policlonal que detecta el extremo carboxilo de N-CAM, se revelaron por quimioluminiscencia y cuantificaron por densitometría. Se detectó una banda específica de 80 kDa para N-CAM. No se encontró correlación entre los niveles de N-CAM y la edad, así como tampoco hubo diferencias con el sexo. Se encontró un aumento significativo en los pacientes portadores de tumores cerebrales respecto de la población control [Md= 1.69(0.54- 12.40 vs 1.06 (0.14- 1.93), p= 0.003 M-W test]. En este trabajo se describe por primera vez la detección en suero de una molécula circulante de N-CAM de 80 kDa. El aumento significativo de los niveles séricos de esta molécula en pacientes con tumores cerebrales podría ser de uti-

lidad como marcador, lo cual facilitaría el diagnóstico certero y el tratamiento en etapas más tempranas.

260. Expresión de ciclina d1 en cancer de mama por western blot e inmunohistoquímica. Giselle Peters, María del C. Vidal, Eduardo Armanasco, Liliana Giménez, Lina Marino, Mercedes Goin, Patricia Elizalde, Carlos Cresta, Elisa Bal de Kier Joffé, Lydia Puricelli

Instituto de Oncología A. H Roffo e Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires.

La sobreexpresión de Ciclina D1, molécula reguladora del punto G1/S del ciclo celular, se ha asociado a la progresión tumoral. Se estudió la expresión de esta molécula en muestras de tumor de mama (n=36) y en tejido peritumoral (n=8). Las muestras fueron homogeneizadas y ultra-centrifugadas y la proteína obtenida sometida a Western blot. Las membranas se revelaron con Ac anticiclina D1 y anti-actina, mediante quimioluminiscencia. La expresión de ciclina se cuantificó por densitometría, normalizada por los valores de actina de cada muestra. Además, 22 cortes histológicos de estos tumores fueron procesados para recuperación antigénica, incubados con anti-ciclina D1 y revelados mediante estreptavidina-peroxidasa y el cromógeno DAB. Los datos fueron analizados en función de los parámetros clínico-patológicos de las pacientes. Por IHQ 8/22 (36%) tumores presentaron tinción nuclear para ciclina D1 en más del 50% de las células. Mediante Western blot se encontró que 7/8 casos mostraron un aumento de 2 a 8 veces en la expresión de ciclina en el tejido tumoral respecto del peritumoral correspondiente. 23/36 (64%) pacientes tuvieron valores de ciclina significativamente elevados respecto del promedio para el tejido "normal". No se encontró asociación entre la expresión de ciclina y el índice mitótico. Los niveles de ciclina se incrementaron paralelamente con los grados histológico y nuclear. No se encontró asociación con estadio, tamaño tumoral o número de ganglios comprometidos. En 16/22 casos hubo coincidencia entre los dos métodos utilizados para evaluar expresión de ciclina. La ciclina D1 podría ser un marcador de utilidad en cáncer de mama.

261. Detección in vivo de tumores primarios y metástasis del melanoma murino B16 a través de radiofármacos marcados con iodo 131. Martín Edreira¹, Jorge Arashiro², Cristina Zarlenga², Silvia Castiglia¹, Oscar Pozzi¹

¹ Comisión Nacional de Energía Atómica, Centro Atómico Ezeiza, Grupo de Radiofarmacia, ² Centro de Medicina Nuclear, Instituto de Oncología Angel Roffo, Universidad de Buenos Aires.

A pesar de los avances logrados en quimio, inmuno y radioterapia, la cura para un melanoma metastásico es solo posible con la remoción quirúrgica del tumor primario y sus metástasis. Las benzamidas marcadas con iodo 131 son radiofármacos captados con alta especificidad por células melanómicas, lo que permitiría su utilización para la detección in vivo de melanomas y sus metástasis, con una alta eficiencia y precisión en técnicas de diagnóstico por imágenes. En nuestro laboratorio se realizó la síntesis y marcación de la N-(2-dietilaminoetil)-3-[¹³¹I]iodo-4-metoxibenzamida (IMBA). A partir de ésta, se llevaron a cabo ensayos de distribución biológica en ratones C57BL/6 normales a la 1, 6 y 24 hs, los que demostraron que el radiofármaco sufre una rápida excreción renal y en menor medida a través del sistema hepatobiliar. A 1 hs postinyección el 30 ± 3% DI/g (% de la dosis inyectada por gramo) fue eliminada por orina, 33 ± 3% se encuentra en estómago y un 20 ± 2% en intestino. Los estudios de captación de la IMBA por células de melanoma se efectuaron sobre un modelo de tumor primario en ratones C57BL/6 portadores de un melanoma B16-F0 en el subcutáneo, la relación de captación tumor/órgano no blanco a las 6 hs fue 10±2 para tumor/sangre y 20±3 tumor/pulmón y para 24 hs de 29±3 y 55±5, respectivamente, y también en ratones C57BL/6 con metástasis pulmonares experimentales, inducidas por la administración endovenosa de la misma línea celular, obteniéndose un aumento

dela %DI/g respecto del pulmón normal en función del número de metástasis (nro. MTTs), %ID/g MTTs / normal: 6 (para 70 MTTs), 4 (36 MTTs), 1,7 (20 MTTs). Asimismo se tomaron imágenes a las 24 horas de cuerpo entero de los ratones y de los pulmones metastatizados, en los cuales se observó captación específica por las células tumorales.

262. Comparación en la eficiencia de detección del ganglio centinela mediante un coloide de albumina y un preparado de sulfuro de antimonio marcados con ^{99m}Tc. ¹Martín Edreira, ¹Elisa Sajaroff, ¹Juan Pérez, ¹Silvia Castiglia, ²Lucas Colombo

¹Comisión Nacional de Energía Atómica, Grupo de Radiofarmacia. ²Area Investigaciones, Instituto de Oncología Angel Roffo, Universidad de Buenos Aires.

La identificación del primer ganglio linfático que drena al tumor (ganglio centinela), a través de compuestos marcados radioactivamente, permitiría a algunos pacientes con tumores sólidos y en los cuales dicho ganglio no se encuentre metastatizado, evitar los efectos nocivos del vaciamiento ganglionar ordinario. En este trabajo se comparó la capacidad de detección del ganglio centinela, por un coloide de albumina y un preparado de sulfuro de antimonio, producidos en el laboratorio, marcados con ^{99m}Tc. Los tamaños de partículas presentes en los compuestos fueron determinados a través del pasaje de los mismos a través de filtros tipo millipore, observándose principalmente un tamaño de partícula de entre 100 nm y 220 nm en el caso del coloide de albumina y entre 2 nm y 100 nm en el sulfuro de antimonio. Se estudió la captación de estos compuestos por los ganglios drenantes de almohadillas plantares en ratones normales a distintos tiempos y en ratones portadores de un tumor de mama M2 creciendo en el subcutáneo de las mismas, a los 40 minutos post-administración. Los compuestos a testear se inocularon intradérmica o intratumoralmente. Los resultados mostraron que los compuestos son eficientes en la localización de ganglio centinela, ya que presentan en éste una alta acumulación, la cual fue decreciendo al aumentar el volumen tumoral. El coloide de albumina resultó más efectivo para la identificación exclusiva de dicho ganglio, debido al alto porcentaje de captación en el mismo, 6% de la dosis inyectada (D.I.), y la baja captación, 0,81% de la D.I., en la segunda estación ganglionar, para un volumen tumoral de 240 mm³. Asimismo, se evaluó la eficiencia de la vía de inyección, resultando la vía intradérmica la más apropiada para la obtención de mayores actividades en ganglios.

263. Implicación del minisatélite *HRAS1* en el carcinoma colorrectal. Ana Vega^{1,2}, Antonio Salas², Clara Ruíz-Ponte¹, María de la Fuente¹, Francisco Barros¹, Angel Carracedo^{1,2}

¹ Unidad de Medicina Molecular. Hospital de Conxo. Santiago de Compostela. España; ² Departamento de Medicina Legal. Universidad de Santiago de Compostela. España.

Recientemente se ha observado que variantes en el minisatélite *HRAS1* se asocian con un incremento de riesgo de cánceres. Este minisatélite tiene una unidad de repetición de 28pb. Se han descrito unos 30 alelos de longitud, 4 de ellos muy frecuentes, denominados "comunes", y los restantes denominados alelos "raros" son los que se asocian con el cáncer. Pero además de presentar variación en longitud también la presentan dentro de la unidad de repetición. **Objetivos:** a) Obtención de un método fácil de análisis del minisatélite, profundizando en el estudio de la variación interna de la unidad de repetición. b) Realización de un estudio poblacional (a partir de sangre periférica de 109 individuos) del sistema *HRAS1*. c) Estudio del minisatélite en pacientes con carcinoma colorrectal esporádico (Se estudió tanto tejido normal como tejido tumoral de 121 pacientes: 47 de localización derecha y 74 izquierda). **Métodos:** La variación interna del sistema se estudió mediante la tecnología MVR-PCR (Minisatellite Variant Repeat- Polymerase Chain Reaction). El tamaño de los alelos *HRAS1* se determinó en un secuenciador automático. **Resultados:**

Se comparan los alelos *HRAS1* encontrados en población control con los de la población de afectos y se encuentra un incremento de alelos raros en la población de afectos (p=0.003). También se encuentra un incremento de genotipos con alelos raros en pacientes con cánceres (p<0.00001). No se observan diferencias en la distribución de alelos en cáncer de colon derecho e izquierdo. **Conclusiones:** La PCR-MVR junto con el análisis de fragmentos en el secuenciador automático se presenta como la tecnología ideal para la categorización de los alelos *HRAS1*. Se demuestra la asociación de alelos raros del minisatélite *HRAS1* y el carcinoma colorrectal esporádico.

TUMORES B

264. La vacunación con células de melanoma B16 irradiadas genera anticuerpos específicos y disminuye el crecimiento tumoral en ratones C57Bl. Laura Bover, Mariano Ochoa, Inés Bravo, Claudia Kairiyama, Adriana Deganutti, José Mordoh

Instituto de Investigaciones Bioquímicas-Fundación Campomar; Centro de Investigaciones Oncológicas – FUCA; Instituto Alexander Fleming, Buenos Aires. Hospital Eva Perón, San Martín.

El objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad de células autólogas tratadas con interferon-alfa e irradiadas, de generar respuesta inmune específica y protección anti-tumoral, utilizando el modelo de melanoma murino B16/C57Bl. Se utilizaron células B16 libres de micoplasma tratadas con IFN- α (500 UI/ml) e irradiadas (50 Gy). 72 horas pre-vacunación se administró una única dosis i.p. de ciclofosfamida (0,45 mg/ratón). Las vacunas se administraron por vía s.c. los días 0, 7, 14, 21, y un refuerzo el día 35 (2 x 10⁵ cél./dosis). Como adyuvante se utilizó QS21 (10 μ g /dosis). El día 42 se desafió a los animales vacunados (n = 4) y a un grupo control sin vacunar (n = 6) con un único inóculo s.c. de 1,3 x 10⁴ células B16 viables. El volumen tumoral al día 66 fue significativamente menor en el grupo vacunado (0,53 cm³) que en el control (4,99 cm³) (Test Wilcoxon; p<0,05). En el 100% de los animales inmunizados, pero no en los controles, se detectaron títulos significativos (1/5000) de anticuerpos anti-melanoma por ELISA (Wilcoxon; p<0,05). Por Western-blot se detectaron bandas específicas de 102, 81, 67 y 48 kDa. Los tumores de los animales vacunados presentaron un importante infiltrado inflamatorio, no observado en los tumores del grupo control. Es posible concluir que: 1) la vacunación con células enteras irradiadas pretratadas con IFN- α induce la formación de anticuerpos específicos en el 100% de los animales vacunados; 2) dicha vacunación inhibe significativamente el desarrollo del melanoma B16 en los animales tratados.

265. Producción de necrosis tumoral y efecto del GM-CSF en un modelo de xenotransplante de melanoma humano en ratones «nude». Silvina Gazzaniga*, Inés Bravo#, Romina Goldszmid*, Julio Martinelli#, José Mordoh³, Rosa Wainstok*

* Departamento Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. #Hospital Eva Perón, San Martín. ³ Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar, Buenos Aires.

Se propuso diseccionar la respuesta inflamatoria producida por la necrosis tumoral y los efectos sobre la misma de la administración local de GM-CSF. Para ello, se transplantó subcutáneamente en ratones *nude* la línea de melanoma humano IIB-MEL-J. Una vez establecidos los tumores, se aplicó un *spray* de nitrógeno líquido (nliq) sobre la epidermis intacta por encima del tumor (día = 0). 18 de 35 ratones tratados recibieron GM-CSF intratumoral. Posteriormente, los animales se sacrificaron a los 2 o 15 días y se efectuó evaluación histológica. En los grupos tratados con nliq, el análisis reveló una necrosis significativa (77-100%) de la masa tumoral, un marcado edema peritumoral e infiltración celular de leucocitos polimorfonucleares (PMN) y macrófagos (M). **Peritumoralmente**, al día 2, se registraron aumentos significativos (p< 0.001, test de

Wilcoxon) en la infiltración de los grupos donde se provocó la necrosis; siendo las medianas y los rangos: (PMN: 20 (2-150); M: 12 (3-150)) vs. control (PMN: 0 (0-5); M: 0 (0-9)). Estas diferencias se observan también a los 15 días post-tratamiento. **Intratumoralmente**, al día 2, la abundancia de células infiltrantes aumenta con el tratamiento conjunto (PMN: 2 (0-34); M: 2 (0-37)) respecto al grupo control sin tratar (PMN: 0 (0-1); M: 0 (0-2)) y al grupo tratado sólo con nliq (PMN: 0 (0-12); M: 0 (0-5)); diferencias que tienden a disminuir a los 15 días. Sólo se detectó crecimiento tumoral en los grupos que no recibieron tratamiento con nliq. Se concluye que, la necrosis por nliq del tejido tumoral incrementa la respuesta inflamatoria peritumoral, mientras que la infiltración intratumoral sólo aumenta por el tratamiento con nliq más GM-CSF.

266. Oligonucleótidos antisense potencian la apoptosis inducida por idarubicina en la línea celular K-562. Luciano Vellón, Teresa Cuello, Patricia Gargallo, Irene Larripa

Departamento de Genética, Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires.

La línea celular K-562 derivada de un paciente con LMC en crisis blástica y portadora del rearreglo bcr/abl de tipo b3a2 es resistente a la apoptosis inducida por inhibidores de topoisomerasa II, como la droga idarubicina (IDA). Se trataron células de dicha línea con complejos de liposomas catiónicos (DMRIE-DOPE y Dcchol-DOPE) y oligonucleótidos antisense (ODNs AS) dirigidos contra el ARNm bcr/abl de tipo b3a2, y non sense (ODNs NS), en una razón 3:1 lípido/ADN, durante 72 horas, luego de lo cual se incubaron durante 24 horas más con idarubicina (IDA), 0.5 µg/ml, para inducir apoptosis. La misma se evaluó por observación morfológica al microscopio de fluorescencia. Las células tratadas con los conjugados DMRIE-DOPE y Dcchol/DOPE con el ODN AS específico para el rearreglo b3a2 mostraron un mayor porcentaje de apoptosis inducida por IDA ($X \pm DS$: 14.74 \pm 2.07 y 20.43 \pm 4.58, respectivamente) comparadas con los controles no tratados con ODNs ($X \pm DS$: 8.08 \pm 0.82); ($p < 0.005$). Los cultivos con ODN-NS no difieren significativamente de los controles. Los datos indican que los ODNs-AS dirigidos contra el ARNm bcr-abl de tipo b3a2 vuelven a las células de la línea K-562 sensibles a la IDA a la concentración mencionada.

267. Participación de IGF-1 en el desarrollo temprano de un tumor ovárico experimental: correlatos hormonales. P. Hockl¹, S. Campo², V.Lux-Lantos¹ y C. Libertun¹

¹ Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET-Universidad de Buenos Aires UBA-ANPCyT, ² CEDIE, Buenos Aires.

El factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 (IGF-1) es una molécula íntimamente relacionada con el desarrollo ovárico. Nuestro objetivo consistió en determinar si dicho factor estaba relacionado con el crecimiento de un tumor experimental ovárico (luteoma, L) a lo largo de las 6 primeras semanas de su desarrollo. Dicho luteoma se obtiene por autoinjerto de un ovario en el bazo de ratas ovariectomizadas en estro, utilizando el ovario contralateral como control (E). Las hormonas se midieron por RIA. Los resultados se expresan como Media \pm ES. La estadística se realizó con ANOVA. El aumento del contenido de IGF-1 sigue un patrón semejante al del DNA, salvo en la semana 3 donde se eleva bruscamente (ng/tumor, E: 27 \pm 6 vs L: 124 \pm 26, $p < 0,01$). En cuanto a IGF-1 sérica, aumenta también en la semana 3 (ng/ml, E: 5107 \pm 219 vs L: 6774 \pm 243, $p < 0,01$). Esto no se debe a un aumento de GH sérica, ya que la misma no se eleva respecto del control a este tiempo (ng/ml, E: 15.8 \pm 1.3 vs L: 14.4 \pm 2.2, n.s.). El contenido de IGF-1 sigue el mismo perfil que el de inhibina A, previamente medida (pg/tumor, E: 2915 \pm 300 vs L: 7906 \pm 1380). A medida que prolifera el tumor aumenta IGF-1. El aumento brusco del contenido de IGF-1 tumoral de la semana 3 estaría relacionado con el aumento de inhibina A. A su vez el IGF-1 sérico aumenta en la misma semana, sugiriendo una relación entre ellas, y serían independientes de GH.

268. Buserelina: efecto sobre la proliferación celular de un tumor experimental ovárico. A.Chamson-Reig, M. Bianchi, C. Libertun y V. Lux-Lantos

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

El desarrollo *in vivo* de un luteoma experimental es inhibido por buserelina (bus: agonista de GnRH) al suprimir LH y FSH. En trabajos previos describimos la presencia del receptor de GnRH en estos tumores, por lo que aquí investigamos un efecto directo del agonista sobre la proliferación de células del luteoma. Comparamos células de tumores de 6 semanas (TUM) con células de ovarios luteinizados (preúberes con 25 UI PMSG, a las 48 h con 25 UI hCG y sacrificadas a los 5 días de hCG: SPO). Las células, obtenidas por colagenización, se incubaron 4 d en DMEM-F12-10% SFB (1.10⁶/pocillo) y luego con bus (1 y 100 ng/ml) por 24, 48 ó 72 h. Durante las últimas 24 h se incubaron en DMEM-F12-0.1% BSA y ³H-Timidina (0.5 µCi/well). Se midieron IGF y progesterona (P) en el medio. La proliferación basal de TUM fue menor que la de SPO a todos los tiempos, $p < 0.01$. Inc ³H-TIM (cpm): TUM: 24h: 2473 \pm 451, 48h: 2512 \pm 506; 72h: 3194 \pm 664, constante a lo largo del tiempo; SPO: 24h: 3780 \pm 627; 48h: 8636 \pm 1828; 72h: 8663 \pm 1258, se observó un pico a las 48 h, $p < 0.01$. Bus, a ambas dosis, inhibió la proliferación sólo en SPO ($p < 0.05$). IGF fue mayor en SPO que en TUM a todos los tiempos (IGF (ng/ml) SPO 24h: 4576 \pm 210; 48h: 6160 \pm 678; 72h: 6367 \pm 171 vs TUM 24h: 2761.5 \pm 670; 48h: 2512 \pm 496; 72h: 3009 \pm 559, $p < 0.01$). P secretada por TUM aumentó a las 48h y fue siempre mayor que en SPO, donde no varió ($p < 0.01$). En conclusión, las células tumorales proliferarían menos *in vitro* que las controles y serían insensibles a buserelina. Una baja tasa de proliferación estaría asociada a baja IGF y alta progesterona.

269. Expresión del RNA mensajero de subunidades de inhibina durante el desarrollo de un luteoma experimental. Eleonora Soriano, Astrid Chamson-Reig, Victoria Lux-Lantos, Carlos Libertun

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

Durante el desarrollo de luteomas experimentales en ratas los patrones de secreción de LH y FSH se encuentran disociados: LH aumenta inmediatamente al primer mes permaneciendo elevada hasta el mes 7, mientras que FSH recién aumenta al tercer mes, y cae a partir del mes 6. Esta regulación diferencial de FSH sugeriría la presencia de inhibinas secretadas por los tumores. Estudiamos la expresión de las distintas subunidades de RNA mensajero de inhibina por Northern blotting en los luteomas de 1, 3 y 7 meses de desarrollo (L1, L3 y L7) y en ovarios durante los distintos momentos del ciclo, expresando los resultados en función del RNA total obtenido por tejido. Se utilizó la expresión constitutiva de G3PDH como control. Se midieron FSH y LH séricas. Observamos que en el primer mes la subunidad β_B se expresa en mayor medida que en el ovario en estro, a los tres meses los niveles caen y se recuperan parcialmente a los siete meses (RNA inhibina subunidad β_B (UA): estro: 3.29 \pm 0.41, L1: 12.64 \pm 4.50, L3: 1.17 \pm 0.75 y L7: 4.11 \pm 2.99, $p < 0,01$). Los valores de FSH (ng/ml) fueron: estro: 7.9 \pm 0.9, L1: 9.9 \pm 1.5, L3: 31.0 \pm 4.4, L7: 13.6 \pm 2.0, $p < 0,05$. Existe una correlación negativa entre la subunidad β_B y FSH en L1, L3 y L7 (Coeficiente de correlación: - 0,76, $p < 0,05$). Estos datos indican que la expresión del mRNA de la subunidad β_B varía en función del tiempo de desarrollo de los luteomas; existe además, una correlación negativa con los niveles séricos de FSH.

270. Expresión de receptores α_2 -adrenérgicos en células tumorales mamarias humanas. Stella Vázquez, Alejandro Miodovan, Alberto Baldi, Isabel Luthy

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires.

Habíamos descripto que los compuestos α_2 -adrenérgicos estimulan significativamente la incorporación de Timidina tritiada en células tumorales mamarias humanas MCF-7 y en líneas del mis-

mo origen desarrolladas en nuestro laboratorio (MH-4, MH-6 y MH-7). El objetivo del este trabajo fue analizar en estas mismas líneas la expresión y cuantificación de los diferentes subtipos de receptor α_2 -adrenérgico descriptos en otros tejidos humanos. Se estudió la expresión por RT-PCR con "primers" descriptos en la literatura y la cuantificación por unión de Rauwolscina tritida a células en cultivo por ensayo de punto único a saturación. Tanto en las células MCF-7 como las líneas MH-6 y MH-7 se observó una banda identificatoria para los subtipos α_2 -C2 y α_2 -C4. No se evidenció en ninguna de estas líneas la presencia del subtipo α_2 -C10. La línea MH-4 mostró una total ausencia de expresión de receptores α_2 -adrenérgicos, aunque estas células proliferan al incubarse con compuestos adrenérgicos. Una posible explicación para este hecho sería una eventual mutación del mismo. La unión de Rauwolscina tritida (13 nM) a las células que resultaron positivas por RT-PCR fue la siguiente (MCF-7: $44,44 \pm 2,67$; MH-6: $31,29 \pm 3,8$; MH-7: $75,09 \pm 6,78$ fmol/ 10^6 células). Conclusión: Se describe por primera vez la expresión de receptores α_2 -adrenérgicos funcionales en células tumorales mamarias humanas.

271. Terapia génica con genes suicidas en modelos de adenocarcinomas murinos. Viviana Bumaschny, Armando Karara, Gabriel Fiszman, Cecilia Casais, Gabriela Sobrido, Gerardo Glikin, Liliana Finocchiaro

Unidad de Transferencia Genética. Área Investigación del Instituto de Oncología "Ángel. H. Roffo". Universidad de Buenos Aires.

El propósito de este trabajo es explorar las posibilidades terapéuticas del sistema gen suicida / pro-droga en el tratamiento del cáncer, empleando DNA vehiculizado por liposomas catiónicos. **Objetivos:** a) desarrollar un sistema de transferencia genética *in vitro* e *in vivo* utilizando lípidos catiónicos; b) clonar el gen de la timidina kinasa del virus herpes simplex (HSV-TK) en un plásmido de alta expresión; c) transferir el gen suicida HSV-TK *in vitro* e *in vivo* a células de adenocarcinomas murinos de mama (M3) y pulmón (P07), determinando la dosis letal media de las mismas al ganciclovir (GCV); d) evaluar el crecimiento tumoral en ratones BALB/c portadores de M3 y P07 tratados con el sistema HSV-TK/GCV. **Métodos y resultados:** Mediante el estudio *in vitro*, utilizando el gen de la β -galactosidasa, se determinó para todos los tipos celulares estudiados una mayor eficiencia de transferencia con la formulación DMRIE:DOPE y relaciones DNA:Lípido entre 1:6 y 1:15 $\mu\text{g}/\text{nmol}$ ($n=4$). Las células neoplásicas transfectadas en forma transitoria con el gen de la HSV-TK resultaron ser entre 50 y 500 veces más sensibles al GCV que las células parentales ($n=3$). En experimentos por duplicado, grupos de 5 ratones BALB/c portadores de tumor M3 fueron inoculados con el plásmido conteniendo el gen de la HSV-TK por vía intratumoral. A los 20 días el grupo tratado i.p. con GCV mostró menor tamaño tumoral [$(0,82 \pm 0,39)$ gr] que el grupo control inoculado con el vector sin inserto y salina [$(2,50 \pm 0,87)$ gr; $p < 0,05$]. En dos experimentos, grupos de 5 ratones BALB/c fueron inoculados con células del tumor P07 transfectadas *ex vivo* con el gen de la HSV-TK. Mientras que los ratones inoculados i.p. con salina desarrollaron tumor al día 8, ninguno de los 5 ratones tratados i.p. con GCV desarrolló tumor al día 20 ($p < 0,01$). **Conclusiones:** Se demostró que los tumores P07 y M3 pueden incorporar y expresar el gen HSV-TK con una eficiencia *in vitro* e *in vivo* suficiente para generar sensibilidad al GCV. Éste parece ser un buen modelo para el estudio de la terapia génica del cáncer con vectores no virales.

272. Efecto de la sobreexpresión de PKC γ en células normales de epitelio de mama. Esteban O. Mazzoni¹, Elisa Bal de Kier Joffe¹ y Julio Aguirre-Ghiso^{1,2}

¹ *Área Investigación, Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", Universidad de Buenos Aires;* ² *Division of Medical Oncology, Mount Sinai School of Medicine, New York NY, USA.*

El fenotipo maligno depende en gran medida de alteraciones en las vías de señalización que regulan la expresión de diversas moléculas participantes en procesos de proliferación, adhesión,

migración e invasión. La familia de enzimas PKC son serinotreonin quinazas, frecuentemente sobreexpresadas en tumores de mama, que además de participar en la vía mitogénica también regulan la expresión de proteasas extracelulares. Para estudiar si PKC está directamente involucrada en las primeras etapas de transformación tumoral, transfectamos con el gen de PKC γ una línea celular normal de epitelio de mama (NMuMG). Mediante selección con G418 se obtuvieron dos líneas: NMuMG-PKC, que expresa la proteína PKC γ y NMuMG-neo, línea control. Se analizaron los patrones de crecimiento de las líneas bajo distintas condiciones: sobre geles de colágeno la línea NMuMG-PKC no fue capaz de formar estructuras de tipo glandular similares a las ramificaciones mamarias, sobre una superficie plástica no apta para el cultivo la línea PKC sobrevivió formando mórulas mayores de 20 cel. y en agar blando formaron colonias ($5,6 \pm 1,2$ vs $0,3 \pm 0,4$ /campo). La línea NMuMG-PKC mostró además una menor capacidad migratoria sobre fibronectina (FN) ($0,1 \pm 0,08$ vs $38,3 \pm 10,5$ mm) y una mayor organización del citoesqueleto con filamentos de actina mas evidentes. NMuMG-PKC presentó un aumento en la expresión de integrina γ -1 ($3,1$ vs 1 UA) y de FN ($2,5$ vs 1 UA) que fue incorporada a la matriz extracelular en forma de fibrillas. Asimismo, se detectó un aumento en la actividad plasminolítica secretada ($1,5 \pm 0,5$ vs $0,2 \pm 0,06$ UI/ml/mg) en la línea NMuMG-PKC. De acuerdo a estos resultados podemos concluir que la sobreexpresión de la enzima PKC γ no sólo lleva a las células normales de epitelio de mama a mostrar diversas características compatibles con un fenotipo transformado, sino otros también sugieren desdiferenciación celular.

273. La expresión de gliptan-3 modula la invasividad y la diseminación metastásica de un adenocarcinoma mamario murino. Eduardo Farías*, Lydia Puricelli*, Jorge Filmus#, Elisa Bal de Kier Joffé*

* *Área Investigación, Instituto de Oncología A.H. Roffo, Universidad de Buenos Aires, #Sunnybrook Health Science Center and University of Toronto, Canada.*

El gliptan-3 (GPC3), un proteoglicano que se une a la membrana por un anclaje GPI, se expresa en el embrión pero no se detecta en la mayoría de los tejidos del adulto, excepto en la glándula mamaria y células mesoteliales. Se conoce que GPC3 participa en la regulación de la proliferación y sobrevivencia en algunos tipos celulares. Para analizar el rol de esta molécula en la progresión tumoral, la línea LM3, derivada de un tumor mamario murino que no expresa GPC3, fue transfectada en forma estable con el gen GPC3 de rata. Se estudiaron las características biológicas de dos clones LM3-GPC3 y dos clones control. Las células LM3-GPC3, que no difirieron de los controles en su morfología ni en su proliferación *in vitro*, fueron más susceptibles a la apoptosis inducida por privación de suero y mostraron menor adhesividad ($1,6 \pm 0,4$ vs $2,9 \pm 0,9$ DO/mm², $p < 0,05$), una demora en las primeras etapas del *spreading* ($p < 0,01$) e inhibición de la migración (21% vs 51% , $p < 0,01$). Asimismo, los clones LM3-GPC3 presentaron una inhibición del 80% en su capacidad para secretar uroquinasa (uPA) ($p < 0,01$), pero respondieron mejor que los controles al tratamiento con TGF β 2, con aumento de la producción de uPA. En cambio, TGF β 2 no moduló la secreción de metaloproteinasas en las células LM3-GPC3 pero indujo un aumento en los clones control. Todos los clones se inyectaron en ratones BALB/c. Si bien no se observaron diferencias en el crecimiento del tumor subcutáneo, los clones LM3-GPC3 mostraron menor invasividad local y desarrollaron un número menor de nódulos metastásicos en pulmón que los clones control, cuando se inocularon iv [Md: 113 (rango 26-200) vs 15.5 (6-57), $p < 0,01$]. En este modelo de células tumorales mamarias, la re-expresión de GPC3 fue capaz de modular el comportamiento invasivo y metastásico.

274. Acido 5-Aminolevúlico y sus derivados en la TFD del cáncer. Adriana Casas, Gabriela DiVenosa, Haydée Fukuda, Alcira Batlle

CIPYP, Departamento de Química Biológica, FCEyN, Universidad de Buenos Aires y CONICET.

La Terapia Fotodinámica (TFD) es un tratamiento para tumores que consiste en fotosensibilizar compuestos como las porfirinas endógenas sintetizadas a partir del precursor, el ácido 5-Aminolevulónico (ALA). Ciertos ésteres derivados del ALA por su mayor hidrofobicidad, se incorporarían mejor a las células e inducirían una mayor acumulación de porfirinas, logrando una TFD más efectiva. El objetivo del trabajo fue estudiar el efecto de estos compuestos sobre células de adenocarcinoma mamario murino (LM2, Htal.Roffo). Se incubaron (10^5 células/well) con distintas concentraciones de ALA o sus derivados y las porfirinas formadas se extrajeron y cuantificaron. La síntesis de porfirinas aumenta con el tiempo de incubación y la concentración de ALA, llegando a un plateau a las 6 hs, (máxima acumulación: ALA 0.6 mM). A 3hs de incubación la máxima cantidad de porfirinas acumuladas fue: ALA 0,6 mM: $46,9 \pm 6,3\text{ng}/10^5\text{cél}$, Hexil-ALA 0,01 mM: $60,0 \pm 4,7\text{ng}/10^5\text{cél}$; Metil-ALA 1,2 mM: $56,3 \pm 3,2 \text{ ng}/10^5\text{cél}$; CDF-ALA 0,2mM: $19,1 \pm 5,6\text{ng}/10^5\text{cél}$. Se incubaron las células 3 hs en presencia de concentraciones equimolares (0.6 mM) de ALA o sus derivados, se irradiaron con distintas dosis lumínicas ($0,04\text{-}5,5 \text{ J/cm}^2$) y a las 21 hs se ensayó la viabilidad con MTT. El compuesto más efectivo a bajas dosis de irradiación fue el Hexil-ALA ($0,04 \text{ J/cm}^2$, 3% de viabilidad). El Metil-ALA fue el menos efectivo ($0,2 \text{ J/cm}^2$, 56% de viabilidad). La TFD a partir de ALA y sus derivados es efectiva en la línea celular LM2.

NEUROCIENCIAS B

- 275. Lateralidad de pie y de mano.** Adriana Ingratta, Anton Coleman, Alicia Merlo, Elena Gómez, Carolina Piacentini, Eduardo Albanese, Jorge Miño, Alfonso Albanese

Facultad de Medicina. Universidad del Salvador. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

Según Lorin y Bryden (1998) la lateralidad de pie más que la de mano reflejaría con mayor precisión la dominancia cerebral del lenguaje. El objetivo fue comparar los scores de lateralidad de mano y de pie. Se administraron a alumnos universitarios (360 femeninos y 122 masculinos) para lateralidad de mano el test de Edimburgo-Oldfield (1971), el test CAAM (Congreso Argentino de Neurociencias; 1998) y un test de pie con 10 items. Estos dos últimos tests fueron diseñados por nuestro grupo. Se determinaron para mano y pie los scores de lateralidad. Los coeficientes de correlación de Spearman (rS) entre scores de mano y pie están entre 0.35 y 0.67 ($p < 0.01$) para ambos tests lo que muestra cierto grado de correspondencia entre sus lateralidades. Para ambos tests los scores de mano y pie difieren significativamente ($p < 0.001$) entre si (test U de Mann-Whitney) tanto en varones como en mujeres. Los scores que muestran lateralidad menos afianzada (derecha o izquierda) se presentan en pie. Esta diferencia entre la dominancia de pie y de mano en 482 casos y el trabajo de Lorin y Bryden, según el cual la lateralidad de pie permitiría inferir mejor que la de mano la dominancia cerebral del lenguaje, deben tenerse en cuenta cuando se pretende considerar la lateralidad cerebral del lenguaje.

- 276. Anticuerpos anti-gangliosidos (IgM anti-GM1) en pacientes con Enfermedad de Motoneurona.** Andres Villa¹, Mariana DiEgidio¹, Pablo López², Gustavo Nores², Olga Sanz¹, Roberto Sica¹, Liliana León³, Juan Morando³

¹ División Neurología. Hospital Ramos Mejía; ² Departamento Química Biológica, Facultad Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba; ³ Servicio de Hemoterapia, Hospital Ramos Mejía, Buenos Aires.

Objetivo: Demostrar un estudio cuantitativo y cualitativo de anticuerpos IgM anti-gangliosido GM1 (anti-GM1) en pacientes con Enfermedad de Motoneurona (EMN). Métodos: Se determinó en suero de 25 pacientes con EMN la presencia de anticuerpos IgM anti-GM1 mediante ELISA y se rastreó su reactividad antiglicolípida mediante High Performance Thi Layer Chromatography (HPTLC). Se utilizó como grupo control 31 sujetos sanos, y 29 pacientes afectados con neuropatía periférica. Resultados: Cin-

co pacientes (32%) con EMN mostraron títulos elevados de anticuerpos IgM anti-GM1 y 2 (7%) de los enfermos controles. Ninguno de los sujetos sanos control mostraron títulos elevados de IgM anti-GM1. Cuatro de los cinco pacientes con EMN y altos títulos de IgM anti-GM1 mostraron patrones de especificidad anti-glicolípida patológicos mediante HPTLC. Conclusión: Se demuestra la presencia de una subpoblación de pacientes con EMN con títulos séricos elevados de IgM anti GM1 con patrones de especificidad anti-glicolípida patológica.

- 277. Acción inhibitoria del estriado sobre las respuestas evocadas en el núcleo caudal del trigémino por estímulos nociceptivos.** Juan Belforte, Cristina Barceló, Andrea Santangelo, Jorge Pazo

Facultad de Odontología y Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Estudios anatómicos, neuroquímicos, electrofisiológicos y farmacológicos sugieren la participación de los ganglios basales en los mecanismos del dolor. Con el fin de profundizar los estudios iniciados sobre el papel del estriado en los mismos, analizamos su acción sobre las respuestas del núcleo caudal del V par a los estímulos nociceptivos, en ratas anestesiadas con Ureano. Para ello se estimula la pulpa dental de los incisivos inferiores y se registra la respuesta de las neuronas del núcleo caudal mediante microelectrodos de vidrio y el reflejo nociceptivo de abertura bucal (JOR), con electrodos implantados en el músculo digástrico. El 43% de las neuronas responden con dos picos excitatorios al diente, el 37% con uno y el 20% con una respuesta compleja (inhibición-excitación). De esas el 59% fueron nociceptivas específicas y el resto multireceptoras. La latencia de la 1ra. respuesta fue de $26,7 \pm 5,9$ mseg y la duración de $55,1 \pm 11$ mseg. ($n=24$) y de la 2da. $90 \pm 6,6$ mseg. y duración $81,6 \pm 14,7$ mseg. ($n=13$). La actividad aumenta de $1,89 \pm 0,5 \text{ Hz}$ a $28,03 \pm 6,7 \text{ Hz}$ ($P < 0,001$, $n=24$) para la 1ra. respuesta y a $8,7 \pm 0,5 \text{ Hz}$ ($P < 0,05$, $n=13$) para la 2da. La activación del estriado con microinyecciones de glutamato ($163 \text{ nmol}/0,5\text{ml}$) inhibe significativamente ($P < 0,001$, $n=24$) esas respuestas nociceptivas del núcleo caudal, así como el JOR. Estos resultados coinciden con una acción analgésica del estriado de la rata, mediada por la inhibición de las neuronas sensoriales del V par.

- 278. Subtipos de receptores muscarínicos de hipocampo y amígdala involucrados en la consolidación de la memoria.** Carlos Blanco, Jorge Quillfeldt, Amancio Ferreira, Fernanda Gaieski, Adriana Rhoden, Daniela Cardoso, Melissa Meinhardt, Fernanda Bittencourt, Edgar Kornisiuk, Diana Jerusalinsky

Cátedra de Anatomía, Facultad de Veterinaria. Instituto de Biología Celular y Neurociencias, Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. Departamento de Biofísica, Universidad Federal de Rio Grande do Sul, Brasil.

La transmisión colinérgica de hipocampo y de amígdala estarían involucradas en la consolidación de la memoria. Los antagonistas muscarínicos no selectivos inyectados en hipocampo luego de entrenamiento en una tarea de evitación inhibitoria (EI) en la rata, producen amnesia. Las toxinas muscarínicas (MTs) del veneno de la serpiente *D. angusticeps* son proteínas selectivas por subtipos de RACHM. MT2 es agonista M_1 , MT3 es antagonista M_4 . Para esclarecer los subtipos de receptores muscarínicos involucrados y su rol, estudiamos el efecto de MT2 y MT3 en hipocampo y amígdala, sobre la consolidación de la memoria de EI. Se caulan ratas Wistar adultas en hipocampo o en amígdala; se coloca una rata en una caja sobre una plataforma estrecha aislada; cuando desciende con las cuatro patas a la grilla/piso, recibe un shock; se mide el tiempo que tarda en descender. Se retira el animal y se lo inyecta inmediatamente. En el test, a las 24 horas, se mide la latencia de descenso de la plataforma, que es una expresión de la retención. MT2 fue facilitatoria en hipocampo (120 seg - 300seg , diferencias significativas entre controles y tratadas, Wilcoxon $p < 0.01$; Mann-Whitney $p < 0.02$; $n=20$),

mientras que en amígdala no afectó la retención. MT3 produjo amnesia inyectada en el hipocampo (Wilcoxon $p < 0.002$; Mann-Whitney $p < 0.02$; $n = 14$), mientras que fue facilitatoria en la amígdala (Wilcoxon $p < 0.01$; Mann-Whitney $p < 0.02$; $n = 18$; Kruskal-Wallis $p < 0.005$, en todos los casos). Se concluye que ambos subtipos de receptores, M_1 y M_4 , operan de modo diferente en hipocampo y amígdala, en relación a la consolidación de la memoria, al menos de esta tarea: M_1 está positivamente involucrado en el hipocampo mientras que no es clara su participación en la amígdala, en cambio M_4 está claramente involucrado en ambas estructuras, pero con efectos opuestos.

279. Efecto de la melatonina sobre la estructura del sueño en pacientes añosos con insomnio primario crónico. Jaime Monti, Fernando Alvario, Daniel Cardinali

Farmacología y Terapéutica, Hospital de Clínicas, Montevideo, y Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia terapéutica de la melatonina en 10 pacientes (8 mujeres y 2 hombres, edad: 66-86 años), tipificados como insomnio primario crónico (DSM-IV). Luego de recoger una muestra de orina entre las 1800 y 0600 h para determinar los niveles de 6-sulfatoximetatonina por RIA, los pacientes recibieron placebo durante 3 noches, melatonina (3 mg p.o.) por los siguientes 14 días y placebo en los últimos 2 días. Se efectuaron polisomnografías en las noches 2-3, 4-5, 15-16 y 17-18. En comparación con la población normal, los pacientes mostraron dificultad en conciliar el sueño y en su mantenimiento, mayor frecuencia de despertares, fragmentación del sueño, desaparición del sueño lento e incremento en el estadio 1, con disminución de la latencia y duración del REM. La administración de melatonina redujo el tiempo despierto durante el sueño (103.7 ± 15.9 vs. 144.3 ± 19.3 min, $p < 0.01$) y aumentó la duración del sueño (349.2 ± 18.6 vs. 306.7 ± 19.7 min, $p < 0.01$) así como su eficiencia (73 vs. 63%). Produjo también un aumento en el sueño en estadio 2 (214.0 ± 7.6 vs. 190 ± 11.6 min, $p < 0.05$), sin modificaciones en el REM. Por análisis espectral se detectó un incremento transitorio en la incidencia de sueño delta y theta en las noches 4 y 5 luego de administrar melatonina. No se verificó correlación entre los niveles previos de 6-sulfatoximetatonina urinaria y la mejorías subsiguiente del sueño por melatonina. Estos resultados avalan la eficacia de la melatonina en los trastornos del sueño en gerentes.

280. Tratamiento prolongado del insomnio con melatonina: Evaluación de cambios hormonales y toxicidad. Carlos Siegrist, Cristian Benedetti, Angela Orlando, Juan Beltrán, Lorena Tuchscher, Claudia Nosedá, Luis Brusco, Daniel Cardinali

Sanatorios Los Arroyos e IPAM, Rosario, Laboratorio de Análisis Bioquímicos e Inmunológicos, Rosario y Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

El presente estudio abierto comprendió 22 pacientes (16 mujeres) de edad promedio 60.1 ± 9.5 años con diagnóstico de insomnio primario. Los pacientes recibieron 3 mg de melatonina p.o. 30 min antes de dormir durante 6 meses. El sueño se evaluó mediante agendas de sueño llenadas por los pacientes (primeros 21 días) y por entrevistas médicas estructuradas posteriormente (a los 30, 60, 120, 150 y 180 días). Previo al inicio del tratamiento se determinó la excreción urinaria nocturna de 6-sulfatoximetatonina. En forma basal y luego de los 6 meses se determinaron en sangre: hemograma, hepatograma, lípidos y niveles de prolactina, TSH, estradiol y FSH. Tanto la evaluación subjetiva como la del médico de calidad de sueño y de vigilia indicó una mejoría significativa a partir del día 5-10, que persistió por el tiempo del estudio (r de Spearman = .94 - 1.00, $p < 0.001$), con reducción del número de despertares y de la latencia del sueño ($r = -.98$, $p < 0.001$). No se observaron diferencias entre muestras basales y a los 6 meses para prolactina (8.50 ± 4.77 vs. 10.80 ± 6.92 ng/ml,

$n = 22$), TSH (2.88 ± 1.20 vs. 3.80 ± 2.60 μ U/ml, $n = 21$), estradiol (44.60 ± 59.85 vs. 33.90 ± 29.69 pg/ml, $n = 16$) o FSH (66.50 ± 43.97 vs. 57.20 ± 26.74 mU/ml, $n = 16$). Tampoco se observaron diferencias en hemograma, hepatograma o lípidos entre ambos tiempos. Se observó una correlación negativa entre niveles de 6-sulfatoximetatonina urinaria y edad (r de Spearman = -0.46 , $p < 0.03$). Estos resultados indican la falta de toxicidad de la melatonina en dosis efectivas para el tratamiento del insomnio.

281. Efecto de agonistas ionotrópicos y metabotrópicos del glutamato sobre la liberación hipotalámica de oxitocina. Macarena Pampillo¹, Beatriz Duvilanski¹, Adriana Seilicovich¹, María del Carmen Díaz¹, Valeria Rettori², Mercedes Lasaga¹

¹ Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. ² Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, CONICET. Buenos Aires.

Se ha demostrado la presencia de receptores de glutamato, tanto ionotrópicos como metabotrópicos en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo, así como la presencia de contactos sinápticos entre terminales glutamatérgicas y neuronas oxitocinérgicas en estos núcleos. En este estudio investigamos el efecto de los agonistas ionotrópicos (NMDA, kainato y AMPA) y metabotrópicos (del grupo I y II) sobre la liberación hipotalámica de oxitocina (OT). La concentración de oxitocina fue determinada por RIA. El NMDA (0.01-1 mM) no modificó la liberación de OT. El kainato (KA) 1 mM aumentó la liberación basal de OT (Control: 84.13 ± 6.83 pg/hipotálamo, KA: 129.70 ± 3.79 , $n = 6$, $p < 0.01$). El quisqualato (QUIS) 1 mM, un agonista AMPA, también estimuló la liberación de OT (Control: 74.88 ± 3.79 , QUIS: 99.13 ± 8.05 , $n = 6$, $p < 0.05$). Concentraciones menores de los agonistas no modificaron la liberación de OT. Los efectos estimulatorios del kainato y quisqualato fueron bloqueados por sus antagonistas específicos DNQX y GYKI 52466 (0.01 mM) respectivamente. Ni el tACPD, agonista metabotrópico I y II, ni el EGLU, antagonista II, modificaron la liberación de OT. Dado que el quisqualato interactúa con receptores metabotrópicos del tipo I, se estudió el posible bloqueo de su efecto estimulatorio por AIDA, un antagonista tipo I. Este antagonista no tuvo efecto *per se* y no bloqueó el efecto estimulatorio del quisqualato, sugiriendo que su acción no se ejercería a través de receptores metabotrópicos. Los resultados indican que el glutamato estimula la liberación hipotalámica de OT a través de receptores tipo AMPA y kainato.

282. Efecto de neuroquinina A sobre la liberación hipotalámica y neurohipofisaria de oxitocina. Andrea De Laurentiis¹, Daniel Pisera¹, Valeria Rettori², Mercedes Lasaga¹, Adriana Seilicovich¹

¹ Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. ² Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, Buenos Aires

La neuroquinina A (NKA), péptido perteneciente a la familia de las taquiquininas, está presente en el eje hipotálamo-hipofisario donde ejerce ciertos efectos neuroendócrinos, como la estimulación de la secreción de prolactina. Considerando que la oxitocina (OT) participa en el control de la secreción de prolactina, nuestro objetivo fue determinar el efecto in vitro de NKA (10^{-6} - 10^{-8} M) sobre la liberación de OT (determinada por RIA) desde el hipotálamo medio basal (HMB) y el lóbulo neurointermedio (LNI) de ratas Wistar macho. La NKA no afectó la liberación de OT desde HMB, mientras que disminuyó significativamente la liberación de OT desde LNI. Ha sido demostrado que el óxido nítrico (NO) reduce la liberación de OT desde NIL. Dado que resultados previos de nuestro laboratorio indican que la NKA estimula la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS), estudiamos la posible participación del NO en el efecto inhibitorio de la NKA sobre la liberación de OT desde LNI. El NMMA (500 μ M), un inhibidor de la NOS, no tuvo efecto *per se* sobre la liberación de OT aunque revirtió la acción inhibitoria de la NKA (10^{-7} M) sobre dicha liberación (C: 17.50 ± 2.43 ng/mg proteína; NMMA: 14.72 ± 2.24 ; NKA: $6.36 \pm$

1.39 [$p < 0.05$ vs C]; NKA+NMMA: 28.47 ± 5.40 [$p < 0.01$ vs NKA]; $n=5-8$). Estos resultados indican que la NKA inhibe la secreción hipofisaria de OT desde NIL por un mecanismo que involucra la síntesis de NO.

283. Disminución de la respuesta a esteroides en el tratamiento de la cefalea en racimos. María de Lourdes Figuerola, Osvaldo Bruera, Lucas Bonamico, Jorge Giglio, Jorge Leston

Unidades de Cefaleas: Hospital de Clínicas y Hospital Francés, Buenos Aires; Hospital Rossi, La Plata.

Introducción: Los corticoides son reconocidos como un tratamiento efectivo de la cefalea en racimos (CR). Hemos descrito previamente un incremento en los niveles plasmáticos de met-enkefalina después del tratamiento con metilprednisona en estos pacientes. Comunicamos ahora una falta de respuesta clínica al tratamiento esteroideo en brotes sucesivos en pacientes con CR. **Pacientes y métodos:** fueron observados 212 pacientes durante un mínimo de dos brotes. El diagnóstico de CR se hizo de acuerdo a los criterios de la International Headache Society y se comenzó con el esquema habitual de metilprednisona (40mg/día, 5 días; 20mg/día, 4 días y 10mg/día, 3 días). Los pacientes que respondieron a este esquema (147/212) recibieron el mismo en brotes sucesivos. **Resultados:** A pesar de la respuesta exitosa en el primer brote, el tratamiento esteroideo fracasó en 21 pacientes en los brotes siguientes, requiriendo otra medicación. **Conclusiones:** para nuestro conocimiento esta es la primera comunicación de resistencia corticoidea en pacientes con CR. Si esta falta de respuesta al tratamiento está relacionada a modificaciones plasmáticas de met-enkefalina requiere nuevas investigaciones.

284. Expresión del receptor Y1 en la retina afectada por proliferación vitreoretinal (PVR). Valeria Cantó Soler¹, Juan Gallo¹, Ricardo Dodds¹, Thomas Hökfelt², Marcelo Villar¹, Angela Suburo¹

¹ Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral; ² Instituto Karolinska, Suecia.

La proliferación vitreoretinal (PVR) consiste en la formación de membranas asociadas a una o ambas caras de la retina. Generalmente estas aparecen después de un desprendimiento de retina o traumatismo ocular. Las membranas, que contienen células contráctiles y una matriz extracelular, se adhieren a la retina produciendo nuevos desprendimientos por tracción. En un trabajo anterior demostramos la expresión del receptor Y1 (RY1) del neuropéptido Y en una subpoblación celular de las membranas. A fin de investigar el origen de estas células estudiamos la expresión de este receptor en áreas de retina lesionada asociadas a las membranas. Las muestras provenían de pacientes con indicación quirúrgica por PVR. Se procesaron inmunohistoquímicamente con anticuerpos contra RY1, o los filamentos intermedios vimentina y desmina. Las retinas contenían numerosas células alargadas que expresaban los tres marcadores. La morfología celular y la presencia de vimentina y desmina indican que se trataba de células de Müller. Por el contrario, en las membranas, las células que expresaban RY1 no tenían inmunoreactividad para dichos filamentos intermedios. Podemos concluir que la lesión retiniana que acompaña a la PVR conlleva una hiperexpresión del RY1 en las células de Müller. La ausencia de inmunoreactividad para desmina y vimentina en las células RY1+ de las membranas sugiere que ellas no se originarían en la neuroretina.

285. Expresión de timidina kinasa transgénica en el epitelio pigmentario y la neuroretina. Angela Suburo¹, Valeria Cantó Soler¹, Juan Gallo¹, María Castro², Pedro Löwenstein²

¹ Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral, Buenos Aires; ² Department of Molecular Medicine, University of Manchester.

En la terapia génica condicionalmente citotóxica se utilizan vectores virales portadores del gen que codifica la timidina kinasa 1 de virus Herpes simplex (TK) seguida por la administración de ganciclovir. Este procedimiento ha sido empleado como tratamiento de la proliferación vitreoretinal (PVR) experimentalmente inducida en conejo por la inyección de fibroblastos. En el humano, las típicas membranas de la PVR habitualmente provienen de las células del epitelio pigmentario o las células de Muller de la retina. Nuestro objetivo fue analizar el patrón de expresión de TK en dichas células después de la inyección subretiniana o intravítrea de un vector adenoviral no replicativo que codificaba TK bajo un promotor de citomegalovirus (sMIEhCMV). Se emplearon ratas Lewis que fueron sacrificadas una semana después de la inyección. La expresión de TK fue detectada inmunohistoquímicamente. Después de la inyección subretiniana, se detectó inmunomarcación local del epitelio pigmentario. En algunos animales, las células marcadas habían migrado al interior de la cavidad vítrea formando membranas adheridas a la retina y al cristalino. Cuando se efectuaron inyecciones intravítreas también se detectó expresión de TK en células de Müller y en neuronas multipolares de la retina. Nuestras observaciones sugieren que la inyección intraocular de vectores virales podría ser utilizada para prevenir la aparición de membranas en pacientes con riesgo de PVR.

286. Efecto del suero de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica sobre la liberación espontánea del neurotransmisor. Salomón Muchnik, Silvana De Lorenzo, Adriana Losavio

Laboratorio de Neurofisiología. Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.

Se ha observado que el suero y/o IG de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ELA) produce alteraciones en la frecuencia los potenciales miniatura sinápticos (fMEPPs) en la unión neuromuscular. En el presente trabajo se reanalizó estos aspectos y se estudió el efecto bloqueante de la nitrendipina 5 μ M sobre los canales de calcio (CCVD) tipo L. En músculos diafragma de ratones CF1, se registró desde la zona de placa la fMEPPs con microelectrodos de vidrio a 18 ± 2 °C. Los grupos experimentales fueron: Controles: ratones no inyectados, $n=13$, ELA: ratones inyectados IP con suero de pacientes con ELA (1cc 72, 48 y 24 horas antes del experimento, $n=15$). La media de fMEPPs no fue diferente en los dos grupos: Control: 1.25 ± 0.27 , ELA: 1.20 ± 0.30 . Cuando se comparó cada experimento de ELA con los valores del grupo control (1.25 ± 0.55 , $n:130$ fibras musculares), se observó que en 3 de ellos la fMEPPs era mayor a la control: 1.59 ± 0.88 $p < 0.03$; 1.74 ± 0.14 $p < 0.003$; 1.58 ± 0.72 $p < 0.036$ y que en otros 3, la fMEPPs era menor a la control: 0.71 ± 0.24 $p < 0.015$; 0.70 ± 0.31 $p < 0.014$; 0.73 ± 0.37 $p < 0.002$. La nitrendipina mostró un efecto bloqueante menor en los ratones inyectados con suero de ELA: Control 35.2 ± 2.9 ($n=4$), ELA 17.6 ± 14.3 ($n=7$), $p < 0.02$. Los presentes resultados sugieren una menor participación de los CCVD de tipo L, quizás con una posible activación de los CCVD tipo N. Tal como ocurre en los recién nacidos, cambios presinápticos compatibles con una denervación, podrían tener un rol en el mecanismo de la enfermedad.

287. Factores Pronosticos y características clínicas de crisis psicogenicas. Walter Silva, Brenda Giagante, Roberto Saizar, Luciana D'Allesio, Silvia Oddo, Damian Consalvo, Silvia Kochen

Centro Municipal de Epilepsia-Unidad asociada al CONICET. Division Neurologia.Hospital Ramos Mejia, Buenos Aires.

Las crisis psicogénicas no epilepticas se confunden por su semejanza con las crisis de epilepsia. El objetivo de nuestro estudio fue identificar aspectos semiológicos que permitan el diagnóstico y factores de riesgo que intervengan en el pronóstico. Se revisaron 161 crisis, identificamos 41 crisis psicogénicas en 17 pacientes que tenían diagnóstico previo de epilepsia. Se hizo el diagnóstico a través de la Video-EEG (registro simultáneo EEG

y semiología crítica). Se utilizó regresión logística para el análisis estadístico. La edad fue 33 años \pm 14,66 (12-69); 70% mujeres; tiempo de evolución previo al diagnóstico 9 años \pm 9,52 (1-30); semiología más frecuentes: movimientos tónico-clónicos 22%, miedo, ansiedad 22%; epilepsia co-existente 41%. Los diagnósticos psiquiátricos más frecuentes: conversión 53%, personalidad dependiente y borderline 25% respectivamente. La semiología clínica sola no permitió establecer el diagnóstico. Sólo dos factores resultaron significativos, los cuales estuvieron asociados con buen pronóstico, vida de relación social independiente (RR=3.6 IC 95% p<0.001) y aceptar la naturaleza no epiléptica de sus crisis (RR=2.3 IC=95%p <0.05).

288. Interacción DOCA / ouabaina (OA) sobre apetito salino y el ARNm de la Na,K-ATPasa cerebral. Claudia Grillo, Monica Ferrini, Gerardo Piroli, Flavia Saravia, Paulina Roig, Bruce McEwen y Alejandro De Nicola

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Instituto Universitario de Ciencias de la Salud, Fundación Barceló, Buenos Aires; The Rockefeller University, New York, USA.

La inducción de apetito salino por DOCA se acompaña de inhibición de la actividad y biosíntesis de la Na,K-ATPasa. A fin de relacionar ambos eventos, ratas tratadas con 5 mg s.c./día X 7 días con DOCA, se infundieron con 25 ng OA/día durante 4 días a través de canulas intracerebrales (IC). En el grupo DOCA + salina IC la ingesta de 3% NaCl se inició a las 48 hs, con un pico a los 9 días y normalización a los 12 días. OA no afectó el apetito salino, mientras que OA + DOCA produjeron un segundo pico de ingesta los días 13-14, en animales ya sin tratamiento. Cortes cerebrales fueron expuestos a sondas oligonucleotídicas codificantes para las subunidades a3 y b1 de la Na,K-ATPasa. En controles infundidos con OA, el b1 ARNm aumentó significativamente en las regiones CA1, CA4 y giro dentado hipocámpico, mientras que DOCA revirtió el efecto de OA. Ej. para CA1: controles 36.1 \pm 6.3 granos/celula; controles + OA: 74.9 \pm 21.5 (p<0.05 vs. controles); DOCA 33.5 \pm 4.0; DOCA+ OA 35.2 \pm 4.9 (p<0.05 vs. controles + OA). Los cambios en el a3 ARNm no fueron significativos. Conclusiones: (1) el aumento del b1 ARNm al inhibir la Na,K-ATPasa por OA es compensatorio; (2) este aumento se bloquea por DOCA; (3) DOCA + OA aumentan en forma retardada el apetito salino. Por consiguiente, ingesta salina e inhibición de ATPasa parecen ser eventos relacionados y regulados por mineralocorticoides.

HEMATOLOGIA

289. Niveles de RNAm plaquetario para PDGF A en trombocitemia esencial. Paula Heller, Laura Kornbliht, Paola Lev, Felisa Molinas

Sección Hematología-Investigación. Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

La trombocitemia esencial (TE) es una enfermedad mieloproliferativa crónica por expansión clonal de megacariocitos y trombocitos. Los megacariocitos secretan y expresan receptores para PDGF. Este factor estimula la megacariocitopoyesis y tendría un rol en la patogenia de la mielofibrosis. En pacientes con TE están disminuidos los niveles intraplaquetarios de PDGF con leve aumento en plasma. Para analizar si esta disminución intraplaquetaria se debe a liberación por activación plaquetaria o disminución de su síntesis, se determinaron los niveles del ARNm para PDGF-A. Se estudiaron 4 pacientes con diagnóstico de TE según criterios establecidos (PVSG, 1987) previo y posterior al tratamiento y un grupo control (n=4). El RNAm plaquetario se estudió por RT-PCR semicuantitativa, amplificando simultáneamente como gen constitutivo el GAPDH y calculándose la relación PDGF/GAPDH (r) por densitometría de geles de agarosa. Se observó una tendencia a la disminución de los niveles de RNAm

para PDGF A en los pacientes previo al tratamiento (r=0.23) con respecto a los normales (r=1.19) (p=0.03). Luego de la normalización de las plaquetas, los valores tendieron a normalizarse, permaneciendo levemente inferiores a los normales (r=0.65). El menor contenido intraplaquetario de PDGF en pacientes con TE, a diferencia de la mielofibrosis idiopática, podría deberse también a disminución en la síntesis.

290. Respuesta fibrinolítica a la oclusión venosa en embarazo normal. Julieta Salviú, Analia Sánchez Luceros, Alicia Blanco, Victoria Nadal, Carlos Marchese*, Roberto Votta*, Susana Meschengieser, María Lazzari

*Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex", Academia Nacional de Medicina; *Hospital General de Agudos "Cosme Argerich", Buenos Aires.*

Objetivo: Evaluar la función fibrinolítica en embarazadas normales, mediante el tiempo de lisis de euglobulinas basal y la respuesta a la oclusión venosa. Se estudiaron 84 normales, 10 de 1^{er} trimestre (T), 28 de 2^{do} y 46 de 3^{er}. La respuesta fibrinolítica (Δ lisis pre-post) se clasificó en buena (>50 min), pobre (30-50 min), mala (<30 min) y ausente (sin respuesta); se consideró prolongada (\uparrow) la lisis de euglobulinas basal >240 min. Referencia: resultados basales y post oclusión venosa, obtenidos en 35 normales no embarazadas. La disminución de la actividad fibrinolítica durante el embarazo, se tradujo en una prolongación significativa (p<0,000001) del tiempo de lisis de euglobulinas basal al comparar los valores obtenidos en el 1^{er} T (289 min \pm 76) respecto al 2^{do} (339 min \pm 75) o al 3^{er} (346 min \pm 69); la diferencia fue también significativa (p<0,01) entre el 2^{do} y el 3^{er}. Se observó una disminución progresiva (p<0,000001) de la respuesta a la oclusión venosa durante el embarazo (1^{er} T:104 min \pm 47; 2^{do} T:55 min \pm 62; 3^{er} T:25 min \pm 40). El porcentaje de lisis basal \uparrow fue 80% en el 1^{er} T y 100% en el 3^{er}. La respuesta post isquemia fue buena en el 70% del 1^{er} T y solo en el 26% del 3^{er}. Los resultados muestran la necesidad de contar con valores de referencia para cada trimestre a fin de identificar alteraciones de la función fibrinolítica intraembarazo, asociadas a complicaciones obstétricas o pérdidas embriofetales.

291. Efecto de la intoxicación crónica por plomo sobre el perfil de las proteínas séricas de anfibio. María Chiesa¹, Carolina Rosenberg^{2,3}, Marcos Arrieta¹, Nilda Fink¹, Alfredo Salibián^{2,4}

¹ Depto. Cs. Biológicas, Facultad Ciencias Exactas Universidad Nacional de La Plata, ² CIC-BsAs, ³ Facultad Ciencias Naturales y Museo UNLP, ⁴ PRODEA, Departamento Ciencias Básicas, UNLuján.

Se evaluó el efecto del Pb subletal sobre las proteínas totales y sus fracciones en suero de *Bufo arenarum* macho. Los sapos se aclimataron a temperatura (20 °C) y fotoperíodo (12D: 12N) constantes. El grupo de tratados-[T] (n, 22) recibió una inyección semanal de 50 mg/Kg de Pb (acetato); los controles-[C] (n, 26) se inyectaron con Ac.Na. Se tomaron muestras de sangre el primer día y luego de seis semanas; en el suero se determinaron proteínas totales (Biuret) y se realizó el fraccionamiento electroforético en acetato de celulosa, buffer Tris-Barbital-Barbital Na, pH 8.8; se usó como control suero humano. Se separaron 4 bandas (albúminas, G1, G2, G3). Los resultados se expresan como g/dL ($\bar{x} \pm ds$); la significancia se probó mediante test t y Anova. Al final del período experimental, en los sapos tratados-[T] las proteínas totales (4.5 \pm 1.7) y la albúmina (1.2 \pm 0.7) disminuyeron significativamente (p<0.01) con respecto a los [C] (5.5 \pm 1.6 y 1.7 \pm 0.6, respectivamente). La G3, en cambio, resultó aumentada (p<0.001) en los [T] (1.7 \pm 0.5) comparada con los [C] (1.3 \pm 0.5); en los [T] la misma fracción al final del período experimental resultó elevada (p<0.001) con respecto al primer día (1.7 \pm 0.5 y 0.9 \pm 0.5, respectivamente). El descenso de las proteínas totales y de la albúmina puede deberse a daños en el parénquima hepático y en el riñón, ambos órganos blanco del metal. El aumento de las G3 podría asociarse a un efecto inmunoestimulador del Pb.

292. Déficit de factor VII: clínica, manejo, y asociación con trastornos de la hemostasia. Patricia Casais, Analía Sánchez Luceros, Adriana Arizó, Silvia Grosso, Laura Gennari, Susana Meschengieser, María Lazzari

Instituto de Investigaciones Hematológicas; Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.

Nuestro objetivo fue revisar las características clínicas de los pacientes con déficit de fVII (fVII), su manejo terapéutico y su asociación con otros trastornos de la hemostasia. Entre octubre de 1995 y agosto de 1998 se estudiaron 21 pacientes (p), 11 de sexo masculino, con una media de 33 años (rango: 7-80). Los motivos de consulta fueron: disminución del tiempo de protrombina (TP) (15p), confirmación del déficit (3p) y sangrado mucocutáneo o post exodoncia (2p). El 71% presentaba antecedentes de sangrado mucocutáneo o post exodoncia, sólo 1 refería sangrado mayor (tubo digestivo). Siete pacientes tenían antecedentes familiares de sangrado. Media del TP: 45% (rango: 6-66%), media de fVII: 31% (rango: 9-60%). Niveles de factor II, X y fibrinógeno: normales. El 23% (5/21) se asoció con enfermedad de von Willebrand(vWD). Se realizaron 6 procedimientos invasivos en 5 pacientes. Tratamientos indicados:concentrados de fVII; plasma fresco congelado, complejo protrombínico y DDAVP. Se observaron complicaciones hemorrágicas menores en una cirugía asociada a CID. Conclusiones:el déficit de fVII se caracteriza por sangrado mucocutáneo; se asocia a vWD en un 23% de los casos y presenta baja incidencia de complicaciones quirúrgicas.

293. Nuevo índice para el discernimiento diagnóstico entre hemólisis y deficiencia de hierro. Carmen Stanganelli, Juana Cabrera, Katia Canalejo, Mónica Aixelá

Departamento de Apoyo Médico, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires.

El receptor soluble de transferrina (sTfR) es proporcional a la masa de precursores eritroides, está aumentado en la hemólisis y también en la deficiencia de hierro. Nuestro objetivo fue encontrar un índice capaz de discriminar si el aumento del sTfR es debido a la deficiencia de hierro o a la hiperplasia eritroide. Se estudiaron 15 sujetos normales, 20 Anemias Hemolíticas (AH) (esferocitosis n=3, déficit de PK n=1, AHAI n=16) y 13 deficiencias de hierro (DH). Se dosó: ferremia, transferrina, % de saturación por técnica convencional y ferritina y sTfR por ELISA. Se definió el índice: $sTfR \times 1000 / \text{ferritina} \times \% \text{ saturación}$. Para cada grupo analizado se informó la media y el intervalo de confianza. El valor del índice fue 10,7 (5,2-16,2) en el grupo normal. Se observó un gran aumento en pacientes con DH: 1278,6 (750-1806) ($p < 0,001$, test de Student). En 17 pacientes con AH el valor fue 11,6 (5,8-17,4), la diferencia fue significativa ($p < 0,001$) si se compara con la DH. En 3 pacientes con AH+DH los valores del índice fueron: 60,6; 1353 y 2111. En ningún paciente con AH el índice excedió 40, valores superiores a este punto de corte estarían indicando una DH secundaria. Se concluye que el índice es un parámetro útil para detectar DH asociada a un trastorno hemolítico, situación frecuente en lugares de consulta de desordenes hemolíticos hereditarios, y a menudo difícil de diagnosticar con los parámetros arriba mencionados analizados en forma independiente.

294. Perfil lipoproteico en pacientes hemofílicos con hepatitis C (He-HCV). Mónica Aixelá*, María Bovcon*, María Calcagno*, Jorge Daruich**, Raúl Pérez Bianco* **

** Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, ** Fundación de la Hemofilia, Buenos Aires.*

Pacientes hemofílicos infectados con el virus de la hepatitis C (HCV) tienen hipocolesterolemia. Según la literatura existe una estrecha relación entre el HCV y el receptor LDL. Se analizó el perfil lipoproteico sérico en tres grupos: I (He-HCV, 50), II (normales, 32), III (HCV, no He, 17). Ninguno recibió tratamiento con interferón ni era HIV+. Se descartaron pacientes con dislipemias

familiares. Se determinaron colesterol total (CT), C-HDL, C-LDL, triglicéridos (enzimático), y Apolipoproteínas (Apo) A1 y B (IDR). Estadística: ANOVA con test a posteriori de Scheffé. Las medias obtenidas fueron, respectivamente, para I, II y III (mg/dL): CT: 156,7; 184,9 y 170,0; C-HDL: 40,8; 50,3 y 40,4; C-LDL: 93,3; 116,4 y 107,7; ApoA1: 1,17; 1,41 y 1,19; ApoB: 0,77; 0,80 y 0,76, TG: 111,3; 80,0 y 122,2. La diferencia fue altamente significativa ($P < 0,01$) entre I y II en CT, C-HDL, C-LDL y ApoA. No fue significativa ($P > 0,10$), para todas las variables, entre I y III, ni entre II y III. En I, los pacientes que presentaban hepato-esplenomegalia (H-E) tuvieron la media más baja de CT (130 mg/dl), y los He severos tenían una media menor (146 mg/dl) que los moderados o leves. Sólo se dosó IL-6 en 13 pacientes del grupo I: en dos se obtuvieron valores 50% más altos que el límite de referencia (ambos con H-E, y uno con HDL de 26). Debido al descenso significativo del CT, C-HDL y Apo A1 en I, además del C-LDL, deducimos un mecanismo inherente al hemofílico: severidad, inmunidad, sistema macrofágico-monocítico, y no sólo el propuesto por la bibliografía sobre HCV-receptor-LDL.

295. Efecto de la intoxicación crónica por plomo sobre el perfil de las proteínas séricas de anfibio. María Chiesa¹, Carolina Rosenberg^{2,3}, Marcos Arrieta¹, Nilda Fink¹, Alfredo Salibián^{2,4}

¹Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas Universidad Nacional de La Plata, ²CIC-BsAs, ³Facultad de Ciencias Naturales y Museo Universidad Nacional de La Plata, ⁴PRODEA, Departamento de Ciencias Básicas, UNLuján.

Se evaluó el efecto del Pb subletal sobre las proteínas totales y sus fracciones en suero de *Bufo arenarum* macho. Los sapos se aclimataron a temperatura (20 °C) y fotoperiodo (12D:12N) constantes. El grupo de tratados-[T] (n, 22) recibió una inyección semanal de 50 mg/Kg de Pb (acetato); los controles- [C] (n, 26) se inyectaron con Ac.Na. Se tomaron muestras de sangre el primer día y luego de seis semanas; en el suero se determinaron proteínas totales (Biuret) y se realizó el fraccionamiento electroforético en acetato de celulosa, buffer Tris-Barbital-Barbital Na, pH 8.8; se usó como control suero humano. Se separaron 4 bandas (albúminas, G1, G2, G3). Los resultados se expresan como g/dL ($x \pm ds$); la significancia se probó mediante test *t* y Anova. Al final del período experimental, en los sapos tratados-[T] las proteínas totales (4.5 ± 1.7) y la albúmina (1.2 ± 0.7) disminuyeron significativamente ($p < 0.01$) con respecto a los [C] (5.5 ± 1.6 y 1.7 ± 0.6 , respectivamente). La G3, en cambio, resultó aumentada ($p < 0.001$) en los [T] (1.7 ± 0.5) comparada con los [C] (1.3 ± 0.5); en los [T] la misma fracción al final del período experimental resultó elevada ($p < 0.001$) con respecto al primer día (1.7 ± 0.5 y 0.9 ± 0.5 , respectivamente). El descenso de las proteínas totales y de la albúmina puede deberse a daños en el parénquima hepático y en el riñón, ambos órganos blanco del metal. El aumento de las G3 podría asociarse a un efecto inmunostimulador del Pb.

296. Variables en la detección de resistencia a la proteína c activada (APCR). Laura Gennari, Alicia Blanco, Emilse Bermejo, Silvia Grosso, Carola Monge, María Lazzari

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.

Objetivo: Analizar la influencia de la técnica y/o reactivos utilizados en la detección del fenotipo APCR. Se utilizó el reactivo APC-Resistance (Chromogenix) con (ROV) y sin (RO) la dilución 1/5 en plasma deficiente en factor V (Instrumentation Laboratory); y la nueva formulación APC-Resistance-V (Chromogenix) con (RVN) y sin (RN) la predilución en el plasma deficiente del equipo. Se estudiaron 246 pacientes, A: 84 (RO/ROV y RN/RNV), B: 87 (RO/ROV) y C: 75 (RN/RNV). Como fuera descripto, la determinación de la APCR en muestras prediluidas en plasma deficiente en FV (ROV, RNV) permitió identificar a los portadores de FV Leiden, (A:6, B:8, C:9). En la mayoría de los casos, la predilución

permitted eliminar la resistencia adquirida (RO o RN anormal; ROV o RNV normal), mediada por la presencia de Lac o factor VIII aumentado (A:3; B:5; C:4); en 7 pacientes (B:1; C:6) no se ha identificado la causa de la discordancia. El hallazgo de 10 pacientes con resistencia normal con la técnica original (RO, RN) y anormal con la predilución (ROV, RNV), de los cuales 8 de los 8 pacientes evaluados son heterocigotas para FV Leiden, obligaría a reevaluar a todos aquellos pacientes analizados exclusivamente con la técnica original y que fueran negativos. Estos pacientes podrían ser portadores del FV Leiden, lo cual implicaría un cambio en la terapéutica o la profilaxis de los mismos.

297. Efecto del alfa-tocoferol sobre viscosidad y fragilidad eritrocitaria en ratas obesas. Gladis Hernández, María del Carmen Gayol*, Marta Rasia

* *Cátedra de Biofísica, Cátedra de Biología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario.*

Datos bibliográficos muestran que en ratas, el agregado de alfa-tocoferol (AT) a suspensiones de glóbulos rojos previene la hemólisis siendo necesaria una dosis menor cuando mayor es el contenido de ácidos grasos poliinsaturados de la dieta. El objetivo de este trabajo fue analizar si la inyección de AT (15 mg/día) producía reversión de algunas de las alteraciones reológicas encontradas en la línea IlMe/Fmb (obesas). Se estudió viscosidad sanguínea (η_s), viscosidad de suspensiones de GR en solución salina tamponada (η_{SF}) y fragilidad osmótica. El análisis estadístico de los resultados se realizó aplicando el test no paramétrico de Wilcoxon. Se encontró una disminución estadísticamente significativa, tanto en η_s (U=47,5; p<.02) como en η_{SF} (U=15; p<.05), al igual que el índice de deformabilidad (TK) estimado a partir de la viscosidad relativa (U=15; p<.05). En tanto que en el valor de la concentración de CINA que produce el 50% de hemólisis (χ_{50}) no se modificó significativamente (U=7). De estos resultados podemos concluir que el AT administrado parenteralmente actuaría sobre el índice de peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana de los GR aumentando su deformabilidad y modificando favorablemente su capacidad funcional, evidenciada en una disminución de la η_s .

298. Perfil hemorreológico en pacientes con Síndrome de Raynaud (SR). María Spengler*, María Svetaz**, Bibiana Leroux***, Marina Rinaldi***

* *Cátedra de Física Biológica, *** Cátedra Dermatología. Facultad de Ciencias Médicas, **Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de Rosario.*

El objetivo de este trabajo es observar las variaciones hemorreológicas y de algunos parámetros bioquímicos en pacientes con SR. Para ello se estudiaron 23 pacientes y 10 controles normales de similar edad. Se determinaron viscosidad sanguínea (η_s) y plasmática (η_p) (con un viscosímetro cono-plato), índice de rigidez eritrocitaria (IR) (por filtración con membrana Nucleopore), velocidad de eritrosedimentación (VES) (por el método de Westergreen), velocidad de agregación eritrocitaria (V) (por luz transmitida), concentración plasmática de fibrinógeno (f_p) (por método gravimétrico) y de Inmunoglobulinas G, A y M (por inmunodifusión radial). En los pacientes se encontraron significativamente aumentados con respecto a los valores normales los siguientes parámetros: η_p (p<.001), IR (p<.01), VES (p<.01), V (p<.01), IgM (p<.001) y f_p (p=0.05). Además se encontró correlación estadísticamente significativa entre V y el contenido de IgM (r=0.398, p<.05), y entre V y el contenido de f_p (r=0.479, p<.01). Las inmunoglobulinas y el fibrinógeno, moléculas capaces de adsorberse sobre la superficie celular, aumentan la tendencia agregante de los eritrocitos afectando la deformabilidad eritrocitaria. Dichos factores podrían constituir un importante obstáculo para el flujo sanguíneo, este hecho se correlaciona con los hallazgos, en los pacientes, de las medidas de la microcirculación cutánea por capilaroscopia convencional.

299. Analisis de la expresion a nivel del mensajero y de membrana de factor von willebrand en leucocitos. Norma Maugeri, Cristina Ibarra, María Lazzari

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Previamente demostramos que los leucocitos polimorfonucleares (PMN) expresan en su superficie factor von Willebrand (fvW), el cual actúa como receptor para adhesión de plaquetas. El objetivo del presente trabajo fue determinar si los PMN producían el fvW observado en la membrana celular. Se realizaron pruebas de biología molecular a fin de detectar la presencia del mensajero (RNAm) codificante para fvW en el citoplasma de los PMN, mientras que la expresión de la molécula fvW de membrana fue determinada por citometría de flujo. Las muestras de PMN y plaquetas (lavados en condiciones estándares) fueron obtenidas de individuos sanos a los que se le descartó toda anomalía hemostática y en particular, la enfermedad de von Willebrand. La determinación por citometría indicó que el 60-80% de los PMN (CD45+) marcaron positivamente para fvW expresando 750 ± 33 unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia media de anti fvW (media \pm SEM; n=23). Se extrajo de RNAm y se sintetizó cDNA por RT-PCR (n=5). Se retrotranscribió el dominio D'(exon 18 al 22) utilizando los primers OL32 y OL23 y beta-actina como control positivo para ambas células. La amplificación mostró un fragmento de cDNA de aprox. 600bp sólo en las muestras de plaquetas y otro de 289bp (beta-actina) en las muestras de plaquetas y PMN. Los resultados indicarían que el fvW expresado en la membrana no es producido por los leucocitos.

300. Activación de la célula endotelial por virus Junín. Mirta Schattner, Ricardo Gomez*, Roberto Pozner, María Lazzari

*Departamento de Hemostasia y Trombosis, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina. *Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.*

A fin de caracterizar el papel de la célula endotelial (CE) en la virosis hemorrágica se recurrió a un modelo representado por CE derivadas de cordón umbilical humano infectadas con 10 UFP/CE de virus Junín. Se utilizaron 2 cepas: XJ-44 (XJ) atenuada y la virulenta P. A los 7 días postinfección se analizó en los sobrenadantes: infectividad viral y niveles de 6-ceto-PGF1 α (PGF1 α) y en las células: expresión de VCAM-1 (VC), ICAM-1 (IC) y factor von Willebrand (fvW) por citometría de flujo. La infectividad viral osciló entre 10³ y 10⁴ UFP/ml. La producción de PGF1 α (pg/ml, X \pm ES, n=3) aumentó en las CE infectadas con P y con XJ (44 \pm 7 y 35 \pm 6 vs 16 \pm 5) respecto al control. La expresión basal de IC (media de la intensidad de fluorescencia, X \pm ES, n=3) aumentó con ambos virus (control: 56 \pm 14 vs P:143 \pm 49 y XJ: 136 \pm 38) mientras que la de VC (33 \pm 6 n=4) no se modificó por la infección de P (27 \pm 5) o XJ (24 \pm 6). En las CE control, la estimulación con TNF α , aumentó 8 veces los niveles de IC y 4.5 veces los de VC. En las CE infectadas con P, tanto IC como VC incrementaron 3.5 veces y en las infectadas con XJ el aumento fue 2.5 veces (n=3). Los niveles de fvW (n=4) disminuyeron respecto del control (460 \pm 72) por la infección con P (323 \pm 37) y con XJ (281 \pm 40). Los resultados sugieren que existe alteración de los marcadores de activación de la CE evaluados consecutiva a la infección viral y la misma podría tener un papel en la patogenia de la fiebre hemorrágica argentina y otras virosis hemorrágicas.

301. El contacto de la glicoproteína ib plaquetaria induce activación leucocitaria. Norma Maugeri, María Lazzari.

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.

Los PMN presentan sobre su superficie factor von Willebrand (fvW), el cual polariza distribución como consecuencia de la adhesión de plaquetas, o al ser tratados con fMPLP, sugiriendo que la

activación es un requisito para la redistribución del fWV. Como hasta el momento se acepta que las plaquetas estimuladas (CD62P +) activan a los PMN, nos propusimos determinar la participación de las selectinas y de la glicoproteína Ib (GPIb) en nuestro sistema. Los PMN ($5 \times 10^6/\text{mL}$) fueron incubados (Tyrode con $\text{Ca } 1\text{mM}$, shear rate 250s^{-1} , 37°C), solos o con plaquetas ($10^8/\text{mL}$) 2min y estimulados (fMLP $5 \times 10^{-7}\text{M}$ o vehículo) por 3min. Se determinó la formación de agregados de plaquetas y PMN (APP en %) y la expresión de CD11b (mean \pm SEM de la intensidad de fluorescencia de anti CD11b). La formación de APP (n=5) fue: basal $20 \pm 4\%$, con MoAb SZ1 (bloqueante para GPIb) $7 \pm 2\%$, con MoAb SZ2 (control de SZ1) $9 \pm 3\%$, con MoAb anti CD62P $15 \pm 3\%$ y con MoAb anti CD62L $19 \pm 15\%$. La expresión de CD11b de PMN estimulados con $5 \times 10^{-7}\text{M}$ fMLP (441 ± 39) aumenta significativamente (n=5; $p < 0.005$) en presencia de plaquetas (701 ± 20), efecto que fue bloqueado sólo por el MoAb SZ1 (534 ± 40 , $p < 0.005$), mientras que los MoAb SZ2, anti CD62P y anti CD62L no mostraron efecto alguno. Concluyendo que el efecto estimulante de las plaquetas se debería al contacto a través de la GPIb plaquetaria al fWV leucocitario durante la formación de APP.

301b. Efecto de la Hipoxia sobre la repoblación hemopoyética en animales aplásicos. Susana Mide

Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires.

La hipoxia induce cambios en los progenitores y células identificables hemopoyéticas, siendo su efecto sobre los stem cells un tema controvertido. Su investigación motiva esta presentación. Se emplearon ratones CFI, irradiados letalmente (800 rads), que se subdividieron en 2 grupos (n=10): Hipoxia (Hx) y Control (C). Hx y C fueron inyectados con 1.4×10^6 células de médula ósea (MO) Hx y MO normocitémica (N) respectivamente. A los 12 días fueron sacrificados, se removieron los bazos, inyectándose 1.4×10^6 células esplénicas (E) de Hx y C a 2 grupos (n 10) de animales normocitémicos con irradiación letal (Siminovitch) (CHx y CC). Fueron sacrificados 12 días después y se determinó la hematimetría, la repoblación hemopoyética (R.H.)=R.M.O. Total + R.E. y el número de colonias esplénicas secundarias (CFU-S₁₂). Los valores significativos fueron: Reticulocitos/ mm^3 Hx $255.500 (\pm 39.7)$ vs C $95.800 (\pm 10.2)$ ($p < 0.001$); Leucocitos/ mm^3 : Hx $1925 (\pm 0.23)$ vs C $850 (\pm 17)$, ($p < 0.001$); R.H.: Hx: $489.6 (\pm 31.32) \times 10^6$ células vs. C: $327.1 (\pm 38.6) \times 10^6$ células ($p < 0.001$); CFU-S₁₂ Hx: $13 (\pm 2)$ vs C: $7 (\pm 2)$, ($p < 0.01$). Estos resultados avalan la mayor capacidad de repoblación hemopoyética de las células esplénicas provenientes de animales CHx, lo cual sugeriría que la M.O.Hx inyectada aumentó la autorreplicación de stem cells y progenitores primitivos en las colonias esplénicas primarias.

NUTRICION

302. Recuperación nutricional y actividad enzimática en timo de rata. Susana Feliu, Slobodianik Nora

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

Trabajos previos demostraron que la administración de una dieta con proteína de maíz, desde el destete, a ratas con desnutrición precoz, exacerba la atrofia del timo, aumentando la actividad de Adenosina deaminasa (ADA) y Purina Nucleósido Fosforilasa (PNP) -enzimas relacionadas con el funcionamiento de los linfocitos T-. El objetivo de este trabajo es estudiar si dicho efecto se revierte por la administración de dieta de proteína de alta calidad y en alta concentración. Ratas Wistar con desnutrición precoz (14-16 crías por madre) recibieron desde el destete y durante 18 días dieta con proteína de maíz al 6.5% y fueron realimentadas con dieta aportadora de caseína al 20%, durante 20 días (R). El lote control de igual edad, recibió desde el destete dieta stock (C). Al finalizar la experiencia, los animales fueron sacrificados, se extrajo y pesó el timo (Pt)(mg), determinándose

la actividad de las enzimas ADA y PNP ($\mu\text{mol } \acute{\text{a}}\text{c. } \acute{\text{u}}\text{r}}\text{ico} \times 10^{-1}/\text{P}$) ($\text{P} = \text{Pt}/\text{P}^{0.75}$ corporal (g)). Los resultados obtenidos fueron: ADA: R: 10.6 ± 1.1 , C: 13.1 ± 2.0 ; PNP: R: 3.3 ± 1.5 , C: 4.6 ± 1.4 , no observándose diferencias significativas entre R y C ($p < 0.01$). Los hallazgos sugieren que la administración de dieta al 20% de caseína durante 20 días, revierte el efecto provocado sobre la actividad de ADA y PNP de ratas con desnutrición precoz que recibieron desde el destete harina de maíz como única fuente proteica. Parcialmente financiado por UBA (TB077).

303. Calcio de la dieta y zinc en sangre, en ratas. Adriana Weisstaub*, Susana Zeni**, Patricia de Ferrer*, María de Portela*

**Sección Osteopatías, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires; *Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Se estudió la influencia del aporte de calcio de la dieta sobre los niveles de zinc (Zn), durante gestación y lactancia en ratas Wistar, hembras, peso: 280 a 350 g. Se alimentaron desde el comienzo de la preñez con dietas con: proteínas: $20\text{g}/100\text{g}$; zinc: 70 p.p.m. ; fósforo: $0.7\text{g}/100\text{g}$; calcio: 0.2, 0.6, $0.9\text{g}/100\text{g}$ (grupos GB, GN y GA, respectivamente). Al parto (To) y al final de la lactancia (Tf) se determinó en sangre entera: Zn (ZnS) ($\mu\text{g}/\text{dL}$) (Espectrometría de Absorción Atómica), y Hemoglobina (Hb; g/dl) (método de ciano-meta-hemoglobina). Se calculó Zn/Hb ($\mu\text{g}/\text{g}$). Los promedios \pm DE fueron: **GB: To:** 11.0 ± 1.6 ; ZnS 862 ± 233 ; Zn/Hb: 78 ± 1.4 . **Tf:** Hb: 12.4 ± 1.2 ; Zn S: 1285 ± 451 ; Zn/Hb 104 ± 35 . **GN: To:** Hb: 10.7 ± 1.4 ; ZnS: 353 ± 43 ; Zn/Hb: 33 ± 2 . **Tf:** Hb: 12.5 ± 1.2 ; Zn S: 373 ± 74 ; Zn/Hb: 30 ± 4 . **GA: To:** Hb: 10.9 ± 1.3 ; ZnS: 321 ± 48 ; Zn/Hb: 30 ± 3 . **Tf:** 13.8 ± 0.7 ; Zn S: 385 ± 61 ; Zn/Hb: 28 ± 5 . Estos resultados evidencian que GN y GA no presentaron diferencias entre sí ni entre To y Tf. Sin embargo, GB presentó un aumento significativo de ZnS y Zn/Hb con respecto a GN y GA, ($p < 0.001$) así como entre To y Tf ($p < 0.001$). Estos resultados evidencian que, durante gestación y lactancia, manteniendo constante el Zn de la dieta existe un aumento de ZnS cuando el aporte de calcio es bajo. **Financiado por Universidad de Buenos Aires, subsidio B 060.**

304. Hidroxiprolina y calcio urinarios, en mujeres de Comodoro Rivadavia. Graciela Ponce#, María Fajardo#, Susana Ortiz#, Susana Sticker#, Patricia Soto#, Adriana Pérez#, Alfonso Nieva, Susana Zeni® y María de Portela*

* Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. # Sección Osteopatías, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires, # Facultad de Ciencias Naturales U.N.P.S.J.B., Comodoro Rivadavia.

Se estudiaron 50 mujeres, de 23 a 64 años, clínicamente sanas, residentes en Comodoro Rivadavia (42°L Sur), ($x \pm \text{DE}$): edad (años): 40.7 ± 12.6 ; peso (Kg): 63.0 ± 9.4 . BMI: 23.1 ± 2.8 . La ingesta de calcio (ICA) ($\text{mg}/\text{día}$) se calculó, por recordatorio del consumo del día anterior, en base a las Tablas de Composición de Alimentos de CENEXA. Se determinó, en orina basal (la segunda de la mañana, recogida en ayunas de líquidos y sólidos, luego de descartar la primera): calcio (Ca) (método cinético, Wiener), hidroxiprolina (OHP) (método de Prockop & Udenfriend) y creatinina (Crea) (método de Jaffé), calculando OHP/Crea ($\mu\text{M}/\mu\text{M}$) y Ca/Crea. (mg/mg) Los resultados por grupo de edad fueron: <30 años: ICA: 786 ± 300 Ca/Crea: 0.041 ± 0.027 ; OHP/Crea: 0.021 ± 0.013 ; 31-40 años: ICA: 677 ± 346 ; Ca/Crea: 0.095 ± 0.099 ; OHP/Crea 0.019 ± 0.010 ; 41-50 años: ICA: 695 ± 382 ; Ca/Crea: 0.089 ± 0.058 ; OHP/Crea: 0.023 ± 0.013 ; 51-64 años: ICA: 801 ± 488 ; Ca/Crea: 0.158 ± 0.076 ; OHP/Crea 0.034 ± 0.012 . Los dos indicadores bioquímicos aumentaron significativamente ($p < 0.01$) en la postmenopausia, respecto de los otros grupos, mientras que en estos mantuvieron en rangos normales aún con consumos de calcio inferiores a la cifra recomendada ($1000\text{ mg}/\text{día}$). Subsidio acreditado por la U.N.P.S.J.B.: PI 009.- Res. C.A. 270/97.

REPRODUCCION

305. Mejora en la tasa de embarazo obtenida luego de prolongar el período de cultivo post descongelación de blastocistos humanos criopreservados. Carlos Quintans, Mónica Donaldson, Marta Rocha, Sergio Pasqualini

Halitus Instituto Médico, Buenos Aires.

El objetivo fue mejorar la técnica de descongelación para blastocistos humanos, pues los protocolos convencionales nos dieron malos resultados. Se trabajó con embriones obtenidos por fertilización *in vitro* o inyección intracitoplasma. Se cultivó por 24 horas en medio HTF con 10% de sustituto de suero (SSS). A partir de ese momento se pasó a una monocapa de células Vero con medio α -MEM con glutamina y 10% de SSS. Los blastocistos no transferidos se criopreservaron con glicerol al 9%. La descongelación se realizó en dos etapas en sacarosa 0.5 M y 0.2M. Previo a la transferencia se cocultivó en 18 casos durante 4-6 horas y en 23 durante 12-16 horas. En 18 ciclos con incubación corta hubo sólo 2 embarazos bioquímicos. En 23 ciclos con incubación larga se obtuvieron 9 embarazos clínicos (tasa de implantación 56.5%, embarazo clínico 39.1%). La aplicación de las técnicas publicadas para la descongelación de blastocistos humanos no resultó en términos de embarazos clínicos. El uso de períodos de cultivo más prolongados produjo un cambio notable en los resultados y dió lugar a una mayor expansión del blastocelo y una mejor morfología de los blastocistos así recuperados. La discrepancia de nuestros resultados con los de otros autores posiblemente se debe a diferencias en protocolos de estimulación y cultivo entre distintos centros.

306. Sobrevida de trasplantes de tejido ovárico humano en ratón Nude (desnudo). Mónica Donaldson¹, Carlos Quintans¹, Laura Moiraghi², Ignacio Asprea¹, Susana Vighi², Nidia Gómez Rueda de Leverone², Sergio Pasqualini¹

¹Instituto Médico Halitus. ²Instituto de Patología y Citología. Buenos Aires.

Exploramos la aptitud del ratón atímico para aceptar trasplantes de corteza ovárica humana, buscando desarrollar una técnica para evaluar la sobrevida de los folículos luego de ser congelados y descongelados. La criopreservación de ovario permitiría conservar la fertilidad en mujeres que deben recibir quimioterapia. Se usaron hembras NIH nu/nu. Once ratones recibieron trozos frescos de corteza ovárica humana debajo de la cápsula renal. El tejido provino de dos donantes, los cortes realizados al tiempo cero mostraron folículos primordiales. En 4 casos se trasplantó también por vía subcutánea (SC). Los trasplantes se recuperaron a las 28 semanas y fueron seccionados en forma seriada para evaluar su morfología. Durante las últimas 6 semanas algunos animales fueron inyectados con hormona foliculo estimulante humana (FSH), otros con gonadotropina de yegua preñada (PMS), un tercer grupo no recibió tratamiento. En 3 casos no fue posible recuperar el tejido implantado. En las 5 ratonas sin tratamiento sólo se recuperó estroma ovárico. En 2 de los 4 animales tratados con FSH se observaron folículos primordiales, primarios y preantrales; mientras que 1 de las 2 que recibieron PMS mostró folículos primordiales. En los 4 trasplantes realizados por vía SC sólo se encontró estroma ovárico. Se demostró que folículos ováricos humanos sobreviven al menos 28 semanas debajo de la cápsula renal de ratonas inmunodeficientes, observándose diferencias según el tratamiento.

307. Inmuno-detección de proteínas tipo caltrín en semen humano. Andrea Dematteis, Anahi Franchi, Carlos Coronel.

Cátedras de Química Biológica, Facultades de Ciencias Médicas y Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba.

Se investigó la presencia de proteínas tipo caltrín (calcium transport inhibitor) en muestras de semen humano, tanto en el

plasma seminal como en espermatozoides lavados. El plasma se sometió a SDS-PAGE y western blotting usando anticuerpos anti-caltrín de diferentes especies. Las células lavadas se fijaron y trataron con anti-caltrín preparado en conejo y posteriormente con anti-IgG de conejo conjugado con FITC. Se analizaron muestras de 31 donantes obtenidas por masturbación de las cuales 18 presentaron dos bandas inmunoreactivas de 34 y 15 kDa, 1 mostró una tercera banda adicional de 25 kDa, 10 tenían sólo la banda de 34 kDa y solamente dos muestras fueron totalmente negativas. El patrón proteico revelado con CBB también mostró ligeras diferencias entre las muestras principalmente en las proteínas de 35 a 14 kDa. Los espermatozoides sometidos a inmunofluorescencia indirecta presentaron inmunomarcación en la porción anterior de la cabeza, sobre la región acrosomal. Los resultados indican que el plasma seminal de humano posee proteínas tipo caltrín las cuales se unen a los espermatozoides sobre la zona acrosomal como se demostró anteriormente en otras especies de mamíferos. Las diferencias en el patrón de proteínas caltrín entre las muestras podrían estar relacionadas con la capacidad fertilizante y la confirmación de esto permitiría el desarrollo de un ensayo clínico para la evaluación de la calidad del semen.

308. Modificación de la liberación de Progesterona por acción adrenérgica en ratas prepúberes. Silvia M. Delgado, Zulema Sosa, Ana Rastrilla, Susana Domínguez*, Luis Scardapane*, Luis Aguado

Laboratorio de Biología de la Reproducción. (LABIR) • Cátedra de Histología. FQBF. Universidad de San Luis

El objetivo del presente trabajo, fue comprobar en ratas prepúberes (30 días) de la cepa Holtzman la liberación de progesterona (P) ovárica, en el sistema integrado *in vitro* Ganglio celíaco- Nervio ovárico superior- Ovario en presencia de noradrenalina (NE), fentolamina (Fen) ó propranolol (Prop), concentración final 10^{-6} M en la cubeta ganglionar. Se incubó el sistema en buffer Krebs-Ringer a 37 °C en baño metabólico. Se extrajo líquido de incubación de la celda ovárica a los 15, 30, 60 y 120 min luego de la estimulación. Se determinó P por RIA. Paralelamente se realizó el control histológico de los ovarios experimentales y controles. Se aplicó Test de Student-significancia $p < 0.05$. Los resultados indican que tanto NE como Prop disminuyen la liberación de P respecto del control en todos los tiempos estudiados (0.088 ± 0.014 vs 0.022 ± 0.003 $p < 0.001$ y 0.088 ± 0.014 vs 0.045 ± 0.007 $p < 0.025$) respectivamente. Mientras Fen tiende a disminuir la liberación de P sin ser significativa (0.088 ± 0.014 vs 0.066 ± 0.013). Morfológicamente no existieron modificaciones significativas derivadas de la estimulación neural. Conclusiones: Los resultados indican que en el sistema estudiado, los agentes adrenérgicos inhiben la liberación de P. En esta fase del estudio no podemos caracterizar el receptor estudiado.

309. Actividad de Metiltransferasa en membranas de células granulosa: su relación con el número de receptores β -adrenérgicos. Mirta Carrasco, Liliana Oliveros, Luis Aguado

Laboratorio de Biología de la Reproducción. Universidad Nacional de San Luis.

Demostramos previamente, en membranas de ovario de ratas adultas con sección bilateral del nervio ovárico superior, cambios en el número de receptores β -adrenérgicos ($R\beta$) y en la actividad de metiltransferasa (MET). En este trabajo se determinó en células granulosa con altos y bajos $R\beta$ de ovarios de rata de 30 días de edad, la correlación entre la actividad de MET (pmol/mg proteína/30 min), $R\beta$ (fmol/mg proteína) y la liberación de Progesterona (P) (ng/ml) y Estradiol (E) (pg/ml) al medio de cultivo. El número de $R\beta$ se determinó con [¹²⁵I]-cianopindolol, MET con [³H]-S-adenosilmetionina, en presencia y ausencia del inhibidor específico 3-Deazaadenosina (DZA), P y E por RIA. Resultados (media \pm SEM): La actividad de MET disminuye con el N° de $R\beta$ ($p < 0.001$): Altos $R\beta = 0.9 \pm 0.06$, Bajos $R\beta = 0.6 \pm 0.04$. Mientras que la liberación de P se correlaciona con la actividad de MET y

el N° de R β , E disminuye con altos R β ($p < 0.001$): Altos R β = 1.3 ± 0.13 , Bajos R β = 11.2 ± 1.3 . La inhibición de la actividad MET con DZA revierte la disminución de E. Un camino neural vía MET podría regular en forma local la esteroidogénesis ovárica.

310. Efecto de la intoxicación crónica con Cadmio sobre el sistema de defensa antioxidante en próstatas de ratas.

Silvina Álvarez y Sofía Giménez.

Cátedra de Bioquímica Molecular. Universidad Nacional de San Luis.

El Cadmio (Cd) es un contaminante ambiental asociado a una mayor incidencia de cáncer de próstata y con conocida capacidad de producir estrés oxidativo en diversos órganos. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la intoxicación crónica con Cadmio sobre el sistema de defensa antioxidante en próstatas de ratas. Ratas machos de la cepa Wistar de 200 g de peso corporal fueron sometidas a intoxicación con CdCl₂ (15 ppm de Cd) en el agua de bebida (grupo Cd) durante 7 semanas. El grupo control (Co) recibió agua sin Cadmio. Luego de ser sacrificadas se separaron los sueros y se extrajeron las próstatas. En ambas muestras se determinó el grado de lipoperoxidación midiéndose las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBAR'S), en los homogenatos se registró la actividad enzimática de Catalasa (CAT), Glutatión peroxidasa (GPx) y Superóxido dismutasa (SOD). Los resultados son la media \pm SEM. Los TBAR'S en suero no mostraron diferencias (Co: $8,85 \pm 2,47$; Cd: $6,97 \pm 0,98 \times 10^{-7}$ nM/mg prot) pero aumentaron en las próstatas Cd (Co: $0,34 \pm 0,11$; Cd: $9,92 \pm 0,52 \times 10^{-5}$ nM/mg prot, $p < 0.0001$). No se modificó la actividad de GPx (Co: $5,6 \pm 0,74$; Cd: $5,52 \pm 0,85$ μ mol NADPH/min/mg prot), disminuyó CAT (Co: $3,66 \pm 0,42$; Cd: $0,87 \pm 0,11 \times 10^{-14}$ moles H₂O₂/mg prot, $p < 0.0003$) y aumentó SOD (Co: 148 ± 13 ; Cd: $249 \pm 19,2$ UI/mg prot, $p < 0.001$) en las próstatas Cd. En nuestras condiciones experimentales la intoxicación crónica con Cadmio afectaría el sistema de defensa antioxidante de la próstata.

311. La estimulación adrenérgica ganglionar modifica, durante el ciclo, la liberación ovárica de Androstenodiona. Zulema Sosa, Silvia Delgado, Marilina Casais, Luis Aguado.

Laboratorio de Biología de la Reproducción, Buenos Aires

Estudios *in vitro* avalan el concepto de que las catecolaminas modulan la síntesis de andrógenos (Dyer y Erickson 1985). El objetivo del presente trabajo fue estudiar si la acción de Nora-drenalina (NE), Fentolamina (Fen) ó Propranolol (Prop) sobre ganglio celíaco modifica la liberación de andrógenos ováricos en ratas en Diestro 1 y 2 (D1 y D2). A ratas hembras Holtzman adultas, se les extrajo el sistema ganglio celíaco (GC)-nervio ovárico superior (SON)-ovario(O), colocando el O y el GC en celdas separadas unidos por el NOS. El sistema se incubó en buffer Krebs-Ringer, a 37 °C en baño metabólico. Se determinó, por RIA, la concentración de Androstenodiona (A₂), en la celda ovárica, a los 30, 60, 120, 180 min. Se considera como basal los valores obtenidos en la fracción ovárica con ácido ascórbico en la celda ganglionar. Se aplicó test de Student significancia $p < 0.05$. **Resultados** (medias pg/mg ovario \pm SEM). En D1, A₂ basal 30' = 1.57 ± 0.1 ; 60' = 2.39 ± 0.09 ; 120' = 1.68 ± 0.1 ; 180' = 3.67 ± 0.32 . Con NE, A₂ disminuye de manera significativa en todos los tiempos ($p < 0.001$), mientras Fen y Prop aumentan de manera significativa ($p < 0.001$). En D2, A₂ basal: 30' = 3.3 ± 0.3 ; 60' = 5.28 ± 0.51 ; 120' = 6.84 ± 0.49 y 180' = 5.42 ± 0.31 . Con NE hay aumento significativo en todos los tiempos estudiados ($p < 0.001$), con Fen y Prop no se observan variaciones. **Conclusión:** La presencia de NE en ganglio, modularía la liberación de A₂ ovárica, de acuerdo al estado del ciclo estral. Estos resultados muestran que la sensibilidad del ovario al estímulo neural depende de su estado fisiológico.

312. "La inhibición de la producción de óxido nítrico (NO) incrementa la frecuencia de batido ciliar en cultivos de células ciliadas de oviducto de rata" Silvina Perez Martínez¹, Ana Franchi¹, Martha Gimeno¹, Manuel Villalón².

¹ Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, Buenos Aires; ² Unidad de Reproducción y Desarrollo, Universidad Católica de Chile.

Estudios previos indicaron que el epitelio oviductal de la rata expresa la isoforma inducible de NO sintasa (iNOS). Para determinar una posible contribución del NO en la regulación de la motilidad ciliar, se investigó si la iNOS se expresa en cultivos de células ciliadas y se midió la frecuencia de batido ciliar (FBC) en presencia de L-NMMA (N-monometil L-arginina), inhibidor de la enzima. Se estudió también el efecto de la progesterona (P₄) sobre la inducción de la enzima en cultivo. Los explantes epiteliales se incubaron en Cámaras de Rose y a los 6 días las células ciliadas formaron una monocapa confluyente con características similares a las encontradas *in vivo*. Estudios de inmunocitoquímica, utilizando un anticuerpo anti-iNOS indicaron que la misma se expresa en estos cultivos y el tratamiento con P₄ (130 nM) incrementa la expresión. La FBC basal medida, utilizando la técnica de microfotodensitometría, fue de 12.1 ± 0.56 Hz. La adición de 100 μ M de L-NMMA en los cultivos control produjo un incremento del 40% en la FBC luego de 60 min de incubación. Este incremento fue revertido con el uso de 600 μ M de L-arginina, el sustrato de la enzima. El tratamiento con el inhibidor en los cultivos pretratados con P₄ produjo una estimulación máxima del 10% luego del mismo período de incubación. Estos resultados demuestran que un inhibidor de la NOS aumenta la FBC en el epitelio oviductal de la rata y que su efecto es atenuado por la progesterona.

313. Actividad de MMP9 en placentas humanas: Modulación por Óxido Nítrico. Carolina Pustovrh, Alicia Jawerbaum, Mario Pesaresi, Mario Baier, Sabina Gotuso, Elida González.

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO) y LINERH (CONICET), División Tocoginecología Hospital C. A. Durand, Buenos Aires.

Las metaloproteasas han sido señaladas como reguladores de remodelación y crecimiento tisular en periodos críticos de la gesta, y se sugiere su participación en cuadros obstétricos de alarma y parto a pretérmino. Dadas las anomalías estructurales y madurativas observadas en placentas de gestantes diabéticas, se evalúa la actividad MMP9 en tejido placentario de gestantes sanas (C) y diabéticas pregestacionales (D) y su modulación por óxido nítrico (NO). Los niveles de NO (mmol/mg prot) están aumentados en D (2.46 ± 0.27 , n=7) con respecto a C (1.11 ± 0.43 , n=6) ($p < 0.05$). Se determina entonces en homogenatos del tejido placentario humano la actividad gelatinasa en gel de poliacrilamida. Las bandas claras se visualizan por contraste con Coomassie R-250 y se evalúan mediante un perfil de lectura densitométrica de unidades comparativas arbitrarias. La actividad de MMP9 (banda de 92 kDa) se incrementa en placentas D ($1,39 \pm 0.01$, n=6) con relación a C=1 (n=6) ($p < 0.01$). Agregando spermin NONOate 600 μ M (dador de NO) la actividad de MMP2 se encuentra intensificada en C (2.02 ± 0.40 , $p < 0.05$, n=6), pero no se observan cambios en D (1.31 ± 0.03 , n=6). En presencia de un inhibidor de la síntesis de NO (L-NMMA 600 μ M), la actividad de MMP9 se encuentra disminuida, tanto en C ($0,61 \pm 0,06$, n=6) como en D ($1,01 \pm 0,03$, n=6) ($p < 0.005$). Estos resultados muestran que la actividad de MMP9 está incrementada en placentas de gestantes diabéticas tipo I, y que el NO parece modular su actividad en tejido placentario humano.

314. Óxido nítrico en fluido folicular humano. Relación con la concentración de inhibinas y estradiol. Alicia Faletti^{a, b}, Felice Petraglia^b

^a Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, CEFYO-CONICET, Buenos Aires, Argentina ^b Cátedra de Ginecología y Obstetricia, Universidad de Medicina de Udine, Italia.

El óxido nítrico (NO) producido a partir de L-arginina por la óxido nítrico sintasa (NOS) parece estar involucrado en muchos pro-

cesos reproductivos. El objetivo de este trabajo fue estudiar la producción de los metabolitos estables del NO, nitritos y nitratos (NOx) en fluido cístico (FC) de mujeres con cistoma ovárico (marcación tumoral negativa) y compararlos con los niveles del fluido folicular (FF) obtenido de mujeres tratadas con hormonas para fertilización *in vitro*. No se encontró ninguna correlación entre los niveles séricos y císticos de NOx medidos con el reactivo de Griess ni diferencia de concentración de NOx en ambos fluidos (FC: 32 ± 5 , FF: $25 \pm 3 \mu\text{M}$). Sin embargo los niveles de NOx estaban positivamente correlacionados con la concentración de estradiol en FC ($r=0.677$, $p<0.01$). Numerosos trabajos demostraron que las inhibinas pueden ser mediadores locales de la foliologénesis. Se determinaron niveles de inhibina A y B (IA, IB) en ambos fluidos por inmunoensayos específicos. La concentración de ambas inhibinas en FC eran significativamente mayores que en FF (FC: IA= 94 ± 6 , IB= 111 ± 12 ; FF: IA= 46 ± 5 , IB= $49 \pm 7 \text{ ng/ml}$) pero en ninguno de los dos casos estaban correlacionados con los niveles de NOx locales. Estos resultados confirman la existencia de una producción local de NO correlacionada con la producción de estrógenos y no con la producción de inhibinas locales.

315. Desarrollo de embriones murinos *in vitro* en distintas condiciones de cultivo. Vanina Fontana, Fernanda Parborell, Liliana Vauthay, Marta Tesone, Monica Cameo

Biología de la Reproducción, Instituto de Biología y Medicina Experimental, Instituto de Oncología Angel H. Roffo, Buenos Aires.

El cultivo de embriones murinos *in vitro* es un modelo comúnmente utilizado para estudiar el desarrollo embrionario temprano. **Objetivo:** Comparar el desarrollo embrionario desde el estadio de 2 células hasta el outgrowth de los blastocistos, en distintas condiciones de cultivo. **Métodos:** Embriones de 2 células ó blastocistos se cultivaron *in vitro* a 37 °C en 5%CO₂ en aire en HTF DMEM-CMRL1066 con distintos suplementos y en presencia ó no de fibronectina (FN). Se calculó el % de blastocistos (Bl.), hatching (Hat.), attachment (At.) y outgrowth (Out.). **Resultados:** Luego de 72 hs de cultivo en medio HTF ó HTF + suero, no se observaron diferencias significativas en el % de Bl. obtenidos ($84.8 \pm 2.3\%$ vs $78.0 \pm 5.6\%$). Luego de 120 hs., el % de Hat. fue $7.8 \pm 3.5\%$ en HTF vs $47.0 \pm 7.8\%$ HTF supl., $p<0.001$. Cuando se cultivaron blastocistos durante 24 horas el % de Hat. fue $33.6 \pm 10.3\%$ HTF/BSA, $40.0 \pm 1.0\%$ CMRL/BSA, $87.3 \pm 3.8\%$ DMEM/BSA, ($p<0.01$ DMEM vs HTF). Luego de 72 hs en DMEM en presencia de FN (50 mg/ml), se observó un $70.3 \pm 4.1\%$ de At. pero no se observó Out. El agregado de 10% de SFB favoreció ambos estadios ($88.3 \pm 11.7\%$ de At. y $65.7 \pm 6.2\%$ de Out.) La calidad del Out. fue distinta en presencia o ausencia de FN. **Conclusión:** *El desarrollo de embriones de 2 células a blastocistos es similar en medio HTF con o sin suplemento proteico. *El hatching está relacionado con el medio de cultivo y el suplemento utilizado. *Para el outgrowth *in vitro*, son necesarios tanto FN como factores séricos aun no definidos.

316. Efecto de la incubación a temperatura ambiente sobre la capacitación y la reacción acrosomal inducida por fluido folicular en espermatozoides humanos. Clara Marín Briggiler, Jorge Tezón, Mónica Vazquez-Levin.

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires.

La capacitación y la reacción acrosomal (RA) pueden llevarse a cabo *in vitro*, incubando los espermatozoides en condiciones definidas, que incluyen generalmente una temperatura de 37 °C. En el presente trabajo se determinó el efecto de la incubación a temperatura ambiente sobre la capacitación y la RA inducida por fluido folicular (FF) en los espermatozoides humanos. Se utilizaron espermatozoides mótils de donantes normospermicos incubados durante 18 h a 37 °C ó 20 °C. Luego de la incubación espermática a 20 °C se observó: a) que el porcentaje de motilidad progresiva fue significativamente mayor, comparado con el de células incubadas a 37 °C ($93 \pm 1\%$ vs. $91 \pm 1\%$ (media \pm EEM)

resp., $p<0,05$; $n=21$); b) que el patrón de proteínas fosforiladas en residuos tirosina presentó escasas bandas y de baja intensidad, similar a lo observado en espermatozoides no capacitados; c) que la inducibilidad de la RA en respuesta al FF (% RA inducida por FF - % RA espontánea) fue significativamente menor, comparada con la correspondiente a espermatozoides mantenidos 18 h a 37 °C (3 ± 1 vs. 25 ± 3 resp., $p<0,01$; $n=9$). Los espermatozoides incubados a 37 °C y luego expuestos al FF a 37 °C ó 20 °C mostraron una inducibilidad de la RA similar (25 ± 3 vs. 19 ± 3 resp., $p<0,01$; $n=9$). Estos resultados indican que la capacitación de los espermatozoides humanos es un evento dependiente de la temperatura, mientras que la RA inducida por FF puede ocurrir a 20 °C, en células previamente capacitadas a 37 °C.

317. Caracterización de anticuerpos poli-clonales polivalentes dirigidos contra membrana de espermatozoides humanos. Andrea Lasserre, Patricia Miranda, Jorge Tezón, Mónica Vazquez-Levin

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires.

La interacción entre las gametas está mediada por proteínas de superficie de los espermatozoides. Estas proteínas pueden ser de origen testicular o pueden asociarse a la membrana plasmática durante el tránsito por el tracto masculino, al encontrarse con las secreciones del epidídimo y de las glándulas accesorias. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar anticuerpos dirigidos contra proteínas de membrana de espermatozoides humanos y caracterizar los antígenos reconocidos. Para ello se obtuvieron extractos de proteínas de superficie de espermatozoides (donantes normospermicos) por extracción con NaCl 1M en buffer con sacarosa 0,25 M. Esta mezcla compleja fue utilizada para inocular conejos. Los sueros inmunes fueron caracterizados por western-blotting, inmunocitoquímica e inmunohistoquímica (epidídimo y testículo humanos). Los sueros inmunes reconocen la región acrosomal de espermatozoides humanos frescos y capacitados. El análisis de cortes de tejido y extractos proteicos de diferentes zonas del tracto reproductor masculino permitió identificar polipéptidos de origen epididimario (60 kDa), testicular (74 kDa) y de glándulas accesorias (50 y 150-180 kDa). En conclusión, se identificaron antígenos de superficie de espermatozoide de origen testicular, epididimario, y de glándulas accesorias.

318. Androstenodiona inhibe la luteólisis espontánea al final de la preñez en la rata. Daniel Carrizo, Carlos Stocco, Ana Rastrilla, Luis Aguado, Ricardo Deis

Laboratorio de Reproducción y Lactancia, Mendoza y Laboratorio de Biología de la reproducción, San Luis.

En estudios anteriores hemos observado que la administración de Androstenodiona (A₂), por vía s.c. (10 mg/0.2 ml vehículo oleoso), durante distintas etapas de la preñez, aumenta los niveles circulantes de progesterona (P) y en el día 19 de preñez interrumpe el proceso de luteólisis fisiológico. El objetivo del presente trabajo fue evaluar si la administración de A₂, al final de la preñez, inhibe el fenómeno de apoptosis luteal. Con este fin estudiamos la formación de oligonucleótidos, una característica de la apoptosis, en animales tratados en la forma descrita con A₂ el día 19 de preñez. Tanto el grupo experimental como el control (inyectados con vehículo) fueron sacrificados 48 hs. después y el DNA de los cuerpos lúteos fue colectado por la técnica de Matsuyomo y col (Biol Reprod. 54: 1996). Mientras que en los animales controles hubo evidente formación de oligonucleótidos en el grupo experimental no se observó presencia de los mismos. En el momento del sacrificio se colectó sangre para la determinación de progesterona circulante. Se aplicó Test de Student, significancia $p<0.05$ y los resultados se expresaron en ng/ml \pm SEM. Los niveles circulantes de progesterona mostraron un aumento significativo (45 ± 0.3) con respecto al grupo control (18.8 ± 0.2). Nuestros datos demuestran claramente que la administración de A₂ inhibe el proceso apoptótico que ocurre espontáneamente al final de la preñez.

TUMORES C

- 319. Caracterización de LM2, línea celular de carcinoma mamario fibroblastoide originado de un adenocarcinoma de ratón.** Ana Eiján, Lucas Colombo, Silvia Vanzuli*, Soledad Galli, María Vidal, Adela Jasnís, Alejo Efeyan, Eugenia S. de Lustig

*Instituto A. H. Roffo, Universidad de Buenos Aires, * I.E.O. Fundación Maissa, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.*

El tumor M2 es un adenocarcinoma mamario transplantable que apareció espontáneamente en hembras BALB/c. Es un tumor sensible a la citotoxicidad por óxido nítrico (NO). Para estudiar los mecanismos involucrados en dicha citotoxicidad, establecimos una línea celular LM2, a partir de subcultivos *in vitro* de células M2, y las comparamos con éstas últimas. Los estudios citogenéticos muestran que tanto el tumor parental como la línea son hipotetraploide (moda M2=75 vs moda LM2=72. En ambos casos, más del 99% de los cromosomas fueron telocéntricos o acrocéntricos. Cuando células M2 o LM2 fueron inoculadas *sc.* en almohadilla plantar de ratones BALB/c, LM2 tuvo mayor tiempo de latencia (8-13 días vs. 6 (6-8) días, $p < 0,001$) y menor tasa de crecimiento ($0,32 \pm 0,05$ n=9, vs. $0,56 \pm 0,05$ n=10, $p < 0,001$) que M2. Las metástasis pulmonares experimentales fueron evaluadas 17 días post-inoculación *iv.* de 10^5 células. LM2 mostró un menor número de metástasis pulmonares (mediana = 33 (0-149) vs. 94 (18-146) n=10, $p < 0,05$) y de menor tamaño que M2. En cultivo, las células LM2 tienen un aspecto sarcomatoide, pero por inmunohistoquímica se demostró expresión de citoqueratinas y ausencia de vimentina, indicando extirpe epitelial. Ni M2 ni LM2 expresaron receptores de estrógenos o progesterona. LM2 no produce NO (medido como nitrito) y es sensible a la citotoxicidad mediada por NO igual que las M2. Concluimos que la LM2 es un modelo útil para estudiar diferentes aspectos de la biología tumoral.

- 320. Aumento del número de Mastocitos en dos tipos de Adenocarcinomas mamarios murinos.** Florencia Rosignoli Lilia Lauria de Cidre

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales; Universidad de Buenos Aires.

Investigaciones realizadas en tumores de distinta estirpe tisular e histopatología, muestran que los mastocitos (MC) abundan en los tejidos peritumorales. Se propuso tomar su número como valor pronóstico, pero los resultados observados no son unánimes. Disponiendo de dos líneas derivadas de un adenocarcinoma mamario murino: LM3, (de fenotipo epitelioide, velocidad de crecimiento moderada y poco invasivo *in situ*) y F3II, (de fenotipo sarcomatoide y alta velocidad de crecimiento e invasividad *in situ*), el objetivo fue evaluar si el aumento de MC se relaciona con mecanismos inflamatorios, tiempo de portación del tumor, su tamaño o fenotipo. Se inocularon lotes de 10 ratones macho BALB/c en forma *sc* con $5 \cdot 10^5$ células de cada línea, utilizando NMuMG (células mamarias normales) como control. Se efectuaron las necropsias de dos animales cada 3 días desde la toma tumoral, para evaluar la variación del número de MC en función del tiempo de portación del tumor. Otros lotes se inocularon con un número fijo de células tumorales de cada línea (2; 3; 4; 5; 6 ó 7 $\cdot 10^5$) y las necropsias se hicieron todas el mismo día para valorar N° de MC en función del tamaño del tumor. Se confeccionaron preparados histológicos teñidos con hematoxilina-Rubypí para la identificación de MC. En todos los experimentos se contó el número de MC en 10 campos de cada uno de tres cortes del mismo tumor. En el F3II, el N° de MC aumentó con el tiempo de portación (18 ± 3 MC desde la toma tumoral a 72 ± 6 MC al último día del muestreo. ANOVA, $p < 0,001$) y con el tamaño tumoral (30 ± 5 a 70 ± 6 MC. ANOVA $p < 0,001$), pero se mantuvo constante y fue menor en LM3 (45 ± 8) y en NMuMG (20 ± 5). En ningún caso se observó componente inflamatorio. Concluimos que en este modelo, el aumento del número de MC solo se relaciona con el fenotipo tumoral. mas agresivo.

- 321. Comportamiento in vivo / in vitro de una nueva línea celular continua (LP07) derivada de un tumor de pulmón espontáneo murino.** Alejandro Urtreger, Miriam Diamant, Stella Ranuncolo, Slobodanka Klein, María del Carmen Vidal, Lydia Puricelli, Elisa Bal de Kier Joffé

Area Investigación, Instituto de Oncología Angel H. Roffo, Buenos Aires.

A partir del adenocarcinoma de pulmón P07, espontáneo en Balb/c, se estableció, por pasajes sucesivos *in vitro*, la línea celular continua LP07 constituida por células epitelioideas altamente heterogéneas en tamaño y forma. La ultraestructura permitió detectar la presencia de gránulos de secreción, uniones intercelulares rudimentarias y estructuras de tipo glandular, confirmando la estirpe epitelial. Sin embargo, la expresión de citoqueratinas fue pobre y las células fueron positivas para vimentina y S100 sugiriendo que se trata de células poco diferenciadas, con componentes neuroendócrinos. La línea LP07 presentó un tiempo de duplicación poblacional de $25,1 \pm 4$ hs., una baja eficiencia de plaqueo ($5,7 \pm 0,9\%$) y fue incapaz de crecer en agar blando. El análisis del número cromosómico mostró cierta heterogeneidad con un predominio de células triploides [Md 58 (23-101)]. Con respecto al tumor de origen P07, la inoculación subcutánea de la línea LP07 mostró una reducción en la latencia ($7 \pm 2,5$ vs. 3 ± 1 días) y en el número de células requerido para generar tumores en el 100% de los animales inoculados (8×10^5 vs. 5×10^4). Sin embargo ambos tipos celulares mostraron similar tasa de crecimiento *in vivo* ($0,53 \pm 0,06$ vs. $0,59 \pm 0,02$ mm/día). Los ratones portadores de los tumores P07 y LP07 desarrollaron síndromes paraneoplásicos como caquexia, aumento del tamaño del bazo (6 y 4 veces respectivamente, $p < 0,01$), hipercalcemia ($5,02 \pm 0,1$ mM en controles vs. $6,82 \pm 0,5$ y $6,69 \pm 0,2$ mM respectivamente, $p < 0,05$) y leucocitosis (5500 ± 580 leucocitos/ml en controles vs. 96000 ± 3600 y 50000 ± 1500 respectivamente, $p < 0,01$). Mientras que la inoculación *i.v.* de hasta 1×10^6 células P07 no reveló la formación de metástasis pulmonares, 5×10^5 células LP07 desarrollaron metástasis en todos los animales inoculados [(Md 10,5 (6-63)]. La línea LP07 constituye un nuevo modelo para el estudio de la biología del cáncer de pulmón y los síndromes paraneoplásicos asociados.

- 322. Selección de una línea de células tumorales resistente a la citotoxicidad por óxido nítrico.** Soledad Galli, Lilia Davel, Adela Jasnís, Elena Sales, Eugenia S. de Lustig, Ana Eiján

Departamento de Inmunobiología Instituto de Oncología Angel H. Roffo, Universidad de Buenos Aires

El óxido nítrico (NO) es capaz de desarrollar citotoxicidad sobre células tumorales. El objetivo de éste trabajo fue seleccionar una línea menos sensible a la citotoxicidad por NO. Cultivos de la línea LM3, fueron tratados durante seis meses (dos ciclos semanales) con un donador de NO, el nitroprusiato de sodio (SNP, 0,25 mM). Se obtuvo una línea más resistente a la citotoxicidad por NO exógeno (LM3-SNP) (65% vs 92%, $p < 0,01$), que produce la misma cantidad de NO que la LM3. Se estudió el desarrollo *in vivo*, y la respuesta inmune del portador de tumor. Los resultados demuestran que las células LM3-SNP inoculadas en forma *sc*, en ratones BALB/c tienen menor incidencia tumoral que LM3 (80% vs 100%) y menor velocidad de crecimiento (LM3-SNP $0,05 \pm 0,03$ mm/día, n=8, LM3 $0,11 \pm 0,02$ mm/día, n=10, $p < 0,001$) Los mismos resultados se observan cuando las células LM3-SNP fueron pasadas previamente por cuatro ciclos *in vivo*. Los ganglios poplíteos drenantes del tumor tienen un 50% menos de actividad de NO sintasas que los ganglios contralaterales. La capacidad citotóxica de los esplenocitos de portador LM3-SNP es del 40% y la del portador de LM3 es sólo del 1%. La actividad angiogénica de las células LM3-SNP es menor que la de la línea parental ($1,54 \pm 0,29$ vs $3,67 \pm 0,29$ vasos /mm² de piel n=7, $p < 0,001$). Conclusión: aunque las LM3-SNP son más resistentes a la citotoxicidad por NO, tienen menor capacidad para crecer *in vivo*, justificada por una menor capacidad angiogénica y una mayor sensibilidad a la respuesta inmune, no mediada por NO.

323. Efecto del óxido nítrico (NO) sobre la reactividad de los ganglios drenantes de un tumor. Ágata D Agostino, Ana Eiján, Adela Jansnis, Elena Sales, Lilia Davel, Eugenia Sacerdote de Lustig

Departamento de Inmunobiología. Instituto de Oncología Angel H. Roffo. Universidad de Buenos Aires.

La función del NO en la biología tumoral es muy compleja. Anteriormente demostramos que el L-NAME (inhibidor de la síntesis de NO) inhibe el crecimiento tumoral y las metástasis. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto del NO sobre la reactividad de los ganglios drenantes poplíteos (GLD) del adenocarcinoma mamario murino S13, inoculado en la almohadilla plantar de ratones BALB/c, tratados vía oral con L-NAME (1g/L). Los GLD aumentan de tamaño, por histiocitosis, sin evidencia de metástasis. El L-NAME reduce el tamaño de los GLD ($p < 0.005$) y cuando estas células son coinoculadas con células S13 en relación 100:1 (ensayo de Winn) inhiben el crecimiento tumoral ($p < 0.05$). Al determinar la actividad de óxido nítrico sintasa (NOS) los GLD presentaron incremento (37%) respecto de ganglios control y de provenientes de animales tratados. En estos dos grupos la adición de LPS + IFN γ indujo mayor expresión de NOS, alcanzando el nivel de actividad obtenidos en lo GLD de animales no tratados. Determinamos por RIA niveles de PGE2 en los GLD; detectándose una disminución del 40% respecto de los ganglios control, pero sin diferencia con respecto a los tratados. La angiogénesis por GLD fue bloqueada por L-NAME ($p < 0.001$). Concluimos que el L-NAME modula la actividad angiogénica de los GL. Los cambios observados en la reactividad NOS y en los niveles de PGE2 indican que el efecto protector de los GLD en el test de Winn sería a través de un mecanismo NO independiente.

324. La infección de hembras transgénicas para WAP-TGF β 1 con el virus del tumor mamario de ratón (MMTV) resulta en la inducción de tumores mamaros y la reversión del fenotipo senescente. Valeria Buggiano¹, Carolina Schere-Levy¹, Marcela Franco¹, Cecilia Cirio¹, Gilbert Smith², Edith Kordon¹

¹ *División Medicina Experimental, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires,* ² *Laboratory of Tumor Immunology and Biology, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.*

Ratones hembras transgénicas para WAP-TGF β 1 son incapaces de amamantar a sus crías debido a la falta de desarrollo lobulillar de la glándula mamaria. A su vez, estos ratones presentan senescencia temprana de las células progenitoras del epitelio mamario. Con el objeto de observar la actividad tumorigénica del MMTV en mamas con este fenotipo, machos FVB/N transgénicos fueron cruzados con hembras GR, Czech, C3H y BALB/c normales infectadas con distintas variantes de MMTVs. Los ratones F1 obtenidos fueron cruzados y las hembras transgénicas fueron incapaces de amamantar a las crías debido a la falta de desarrollo lobulillar. En estos ratones se observó también una inhibición significativa en la incidencia de lesiones preneoplásicas lobulillares ($p < 0,05$). Sin embargo, en todas las combinaciones de cepas utilizadas, no existieron diferencias significativas en la incidencia tumoral entre ratones transgénicos y no transgénicos. Por ejemplo, 14/14 vs 15/15 con el MMTV(GR). Estos resultados demuestran que la actividad inhibitoria del transgen sobre el epitelio secretorio no afecta significativamente la actividad tumorigénica de las variantes de MMTV utilizadas. Sin embargo, en experimentos de trasplantes, las células implantadas, tanto transgénicas como no transgénicas, fueron capaces de repoblar la almohadilla de grasa subcutánea en 6 de los 8 trasplantes realizados para cada caso. A nuestro entender, este rescate de la senescencia de las células progenitoras está estrechamente ligado a la capacidad tumorigénica del MMTV.

325. Efecto del arsenito de sodio en poblaciones de macrófagos de ratones. Mónica Palmieri, Deborah Tasat, Silvia O'Connor, Beatriz Molinari

Departamento de Biología, Facultad de Cs.Exactas y Naturales, UBA; Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad San Martín; Radiobiología, Comisión Nacional de Energía Atómica, Buenos Aires.

Previamente demostramos que concentraciones crecientes de arsenito de sodio disminuyen la incidencia tumoral (SAIC1998) en ratones Sencar. A fin de correlacionar este efecto con la actividad de las células inflamatorias, hemos analizado aspectos del metabolismo oxidativo de las poblaciones de macrófagos peritoneales (MP) y alveolares (MA). Los animales sometidos a carcinogénesis experimental (DMBA/TPA) bebieron agua común ó con arsenito de sodio (20 mg/l). La producción de anión superóxido fue medida con el test del NBT, y la densidad óptica de la formazana precipitada se evaluó por medio de análisis digital de imágenes. Se cuantificó el número de células reaccionantes en función del número total de células extraídas del peritoneo o del pulmón de cada animal. El porcentaje de MP reaccionantes en animales con arsenito vs control fue 33.2 ± 3.2 vs 43.9 ± 3.5 ($p < 0.05$). Esta disminución también se observó para MA: 37.9 ± 3 vs 50.7 ± 5.1 ($p < 0.05$). También se demostró que la respuesta de macrófagos de animales experimentales tratados con arsenito está autoregulada como en las células de animales control no siendo así en células provenientes de animales experimentales sin arsenito. El tratamiento con arsenito reduce los niveles de estrés oxidativo en células inflamatorias y podría explicar la disminución en el número de tumores en animales tratados con arsenito.

326. Acción del Tamoxifeno en la hepatocarcinogénesis químicamente inducida. Esther Gerez, Fabiana Caballero, Leda Oliveri, Nora Falcoff*, Alcira Battle, Elba Vazquez.

*Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP), CONICET – Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA y *Hospital Municipal de Vicente López, Dr. B. Houssay, Buenos Aires.*

El tamoxifeno (TMX) es un potente agente promotor en hígado de rata, que forma aductos con el ADN y se une irreversiblemente a proteínas microsomales. Se estudió el efecto del TMX en ratones tratados con p-dimetil-amino-azobenceno (DAB). Se emplearon 8 ratones machos (CF1) que recibieron DAB (0,5% p/p) y/o TMX (0,025% p/p) en la dieta durante 28 semanas, con los correspondientes controles. Se evaluó el índice de peroxidación lipídica por determinación de las especies reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) y el sistema antioxidante a través de las enzimas catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD), analizándose estadísticamente por el Test de Student con un $p < 0,01$. El contenido elevado de TBARS (nmol/mg): DAB= $0,573 \pm 0,103$; DAB+TMX= $0,445 \pm 0,080$; TMX= $0,216 \pm 0,040$ (Valor normal, VN= $0,135 \pm 0,024$) y la baja actividad de catalasa (U/mg): DAB y DAB+TMX= $1,75 \pm 0,22$ (VN= 3.9 ± 0.5) reflejan el cuadro característico del estado oxidante provocado por estas drogas. La SOD disminuyó en el grupo DAB: 189 ± 20 y aumentó en el grupo DAB+TMX= 472 ± 45 (TMX= 470 ± 40 ; VN= 315 ± 32 U/mg). La histología reveló displasia hepatocitaria en los grupos DAB y DAB+TMX, pero sólo en el DAB+TMX se diagnosticó carcinoma hepatocelular sólido, trabecular y acinar, indicando que el TMX puede participar en la iniciación y promoción de tumores hepáticos, por lo que debe tenerse en cuenta su daño potencial cuando se administra en forma prolongada.

327. Mecanismos de inhibición tumoral durante el estado de preñez. Marcela Franco, Pedro di Gianni, Roberto Meiss, SilviaVanzulli, Edith Kordon, Oscar Bustuobad, Raúl Ruggiero

Instituto de Investigaciones Hematológicas y Centro de Estudios Oncológicos, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.

La preñez inhibe el crecimiento de tres tumores murinos (LB, MC-C y C7HI). El objetivo fue determinar los mecanismos involucrados. La citotoxicidad mediada por células o anticuerpos

fue similar en preñadas y vírgenes portadoras de tumor, por lo que esta inhibición no sería atribuible a un mecanismo inmunológico. La implantación de pellets de estrógenos (E) o progesterona (P) que reproducen concentraciones séricas de E y P similares a las de la preñez, no alteró el crecimiento de LB o MC-C mientras que el de C7HI fue exacerbado por P e inhibido por E. Esto sugiere que E y P presentes en la preñez no serían responsables de la inhibición de LB y MC-C. Por otro lado, los niveles de P podrían explicar la estimulación del crecimiento de C7HI observada hasta el día 9 de gestación y los niveles de E explicarían la inhibición de C7HI después del día 15 pero ninguna de ellas explicaría el plateau observado en su crecimiento entre los días 9-15 de gestación. Comparativamente, la presencia de teratomas (masas benignas de tejido embrionario que no inducen cambios hormonales) inhibió el crecimiento de los 3 tumores. Por ej: volumen de MC-C (día 35 de su crecimiento) en portadores de teratomas=827 ± 277 mm³ (n=6) vs MC-C en controles= 2804 ± 852 mm³ (n=4; P<0.05). El suero de portadores de teratoma (ST) y de preñadas (SP) inhibió la proliferación tumoral *in vitro* con respecto al suero normal (SN). Por ej, para MC-C: ST=70 ± 6 UI₅₀/ml (n=3, P<0.05), SP=84 ± 7 UI₅₀/ml (n=3, P<0.02) y SN=31 ± 9 UI₅₀/ml (n=6). Los resultados sugieren que los tejidos embrionarios inducirían factores circulantes, no relacionados con el estado inmunológico ni hormonal, que serían responsables, al menos en parte, de la inhibición de tumores observado durante la preñez.

328. Influencia de la preñez sobre el crecimiento de tres tumores murinos. Pedro di Gianni, Marcela Franco, Roberto Meiss, Silvia Vanzulli, Edith Kordon, Oscar Bustuabad, Raúl Ruggiero

Instituto de Investigaciones Hematológicas y Centro de Estudios Oncológicos, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.

La influencia de la preñez sobre el crecimiento tumoral es tema de gran controversia. Se estudió el efecto de la preñez sobre el crecimiento de tres tumores murinos: LB, MC-C y C7HI implantados en ratones BALB/c 1-5 días antes del comienzo de la preñez. El crecimiento de los tumores que no poseen receptores de estrógenos (RE) ni de progesterona (RP) (LB y MC-C) fueron inhibidos a lo largo de toda la preñez. Por ej: LB en preñadas (día 18)= 4033 ± 267mm³ (n=56) vs LB en vírgenes= 6700 ± 833 mm³ (n=41) (P< 0.02); MC-C en preñadas (día 52, al cabo de dos rondas de preñez)= 800 ± 154 mm³ (n=19) vs MC-C en vírgenes= 6167 ± 731 mm³ (n=18) (p<0.002). El tumor C7HI (que posee RE y RP) exhibió tres fases: el crecimiento tumoral fue estimulado hasta el día 9 de gestación, alcanzando un plateau para luego inhibirse drásticamente después del día 15. Por ej: C7HI en preñadas (día 80, luego de 3 rondas sucesivas de preñez)=417 ± 117 mm³ (n=6) vs C7HI en vírgenes=2545 ± 222 mm³ (n=6) (p<0.001); en cuanto al número de metástasis pulmonares C7HI en preñadas= 4.2 (rango: 0-17) vs vírgenes=96.2 (rango: 8-173) (p<0.001). Los resultados obtenidos sugieren la existencia de mecanismos inhibitorios del crecimiento tumoral durante la preñez y proveen un modelo útil para su estudio, permitiendo analizar comparativamente tumores que difieren en su tipo histológico, respuesta hormonal e inmunogenicidad.

CARDIOVASCULAR

329. Agregación eritrocitaria y proteínas plasmáticas en primigestas, en el segundo trimestre del embarazo. Adriana Bollini, Gladis Hernández, Marta Bravo Luna, Marta Rasia

Cátedra de Biofísica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario.

Según distintos estudios la agregación eritrocitaria (AE) podría brindar información respecto a la eficacia de la perfusión placentaria. La AE es un proceso que depende del hematocrito (hto) y de la concentración (cc) de proteínas plasmáticas. En el embarazo nor-

mal ocurren cambios de ambos. En este trabajo se estudió la influencia de estas modificaciones sobre la AE. Se determinó la cc de proteínas totales (pt), albúmina (alb), globulinas (gl) y fibrinógeno (fb) por colorimetría y AE por fotometría, en primigestas (n: 50, 23±3.5 semanas de gestación, edad = 22 ±4) y en controles (n:30, edad=29±7). Estadística: t de Student (para muestras no apareadas). Las cc de pt, gl, y fb fueron significativamente mayores al igual que los parámetros de AE en primigestas (t; p<0,01) (2,476; 5,09; 2,78: 5,25; 4.1), mientras que la cc de alb y el hto disminuyeron significativamente (t; p<0,0001) (5,01; 6.3). Estos resultados indican que, aún verificándose una disminución del hto -esperable durante el embarazo debido a un aumento del volumen plasmático que no se acompaña de un aumento proporcional del porcentaje de glóbulos rojos - se produce un aumento en la AE que puede ser atribuido a una variación del perfil proteico durante la gravidez consistente en una disminución en la cc de alb (considerado un agente antiagregante) y un aumento de las cc de gl y fb (los agregantes plasmáticos fisiológicos).

330. Influencia de doce meses de terapia hormonal de reemplazo (THR) en mujeres menopáusicas sobre el perfil hemorreológico. María Spengler, Guillermo Mengarelli, Guillermina Goñi, Marta Bravo Luna, Marta Rasia

Cátedra de Física Biológica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario.

El riesgo de enfermedad cardiovascular en la mujer menopáusica ha sido relacionado a los cambios hormonales concomitantes, comprobándose su disminución por THR. *Objetivo:* Estudiar el efecto de THR en 32 mujeres menopáusicas a los 6 y 12 meses de tratamiento, analizando factores hemorreológicos y hematimétricos, perfil lipídico y presión arterial, comparándolos con sus respectivos basales. *Métodos:* viscosidades sanguínea y plasmática (η_s y η_p); viscosímetro cono-plato; índice de rigidez (IR): filtración; índices hematimétricos, concentración de fibrinógeno (F), colesterol, HDL, LDL, triglicéridos (Tg) y presión arterial por los métodos clásicos. *Resultados:* Observamos que la η_s a 230 s⁻¹ y a 115 s⁻¹ disminuyó (p<0,01) a los 6 meses de tratamiento, manteniendo dicho valor a los 12 meses. Esta modificación se acompañó de un descenso (p<0,01) de: η_p , IR y F. Además, a los 6 meses se produjo un aumento (p<0,05) en el HDL, con una tendencia (p=0,08) a la disminución de Tg; persistiendo a los 12 meses el aumento de HDL y alcanzando significado (p<0,05) el descenso de Tg. No se modificaron la presión arterial ni los índices hematimétricos. *Conclusiones:* Nuestros resultados demuestran que el tratamiento produjo, en los primeros seis meses, mejoras en la reología sanguínea y en el perfil lipídico de la mujer menopáusica, permaneciendo la protección contra el riesgo cardiovascular durante los siguientes 6 meses de tratamiento.

331. Intervalo QT del electrocardiograma. Su relación con la longitud del ciclo previo (RRp). María Bernasconi¹, Héctor Berra¹, Stella Bertoluzzo², María Perrone³

¹ *Cátedra de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas,*
² *Cátedra de Física. Facultad de Bioquímica.* ³ *Cátedra de Fisiología, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Rosario.*

La prolongación del intervalo QT del electrocardiograma (ECG) se asocia con la aparición de arritmias cardíacas. Sin embargo, la posibilidad de asignarle un valor predictivo a un QT largo detectado en la clínica, está limitado por el escaso conocimiento de su dinámica básica (cambios latido a latido). La dependencia de la duración del potencial de acción respecto a la duración del período de reposo previo, ha sido estudiada *in vitro*. *Objetivo:* Estudiar la relación QT/RRprevio, latido a latido, en reposo. *Método:* Se registraron ECGs continuos, en reposo, durante 20 seg. en 14 individuos sanos, varones y mujeres, sin antecedentes cardiovasculares y con examen físico negativo. Se utilizó la derivación con mayor amplitud y duración de la onda T. Se midieron los intervalos QT y RR. Se obtuvieron las relaciones QT/RR y QT/RR previo y sus respectivos coeficientes de correlación en cada

uno de los sujetos.. **Resultados:** Las medias de los coeficientes de correlación de las relaciones QT/RR y QT/RRprevio fueron significativamente diferentes: $0,15 \pm 0,11$ y $0,27 \pm 0,14$ respectivamente ($p < 0,05$). **Conclusión:** Los valores de QT latido a latido, en reposo, parecen estar mejor correlacionados con la longitud del ciclo precedente que con la del ciclo al que pertenecen. . Esto es coincidente con lo descripto en la literatura respecto al potencial de acción de fibras ventriculares y de Purkinje.

332. Los péptidos natriuréticos BNP y CNP aumentan la captación de noradrenalina en diferentes áreas y núcleos del sistema nervioso central. Martín Rodríguez Fermepein, Marcelo Vatta, Liliana Bianciotti, Belisario Fernández.

Cátedras de Fisiopatología y Fisiología. FFyB, Universidad de Buenos Aires.

Demostamos que el péptido natriurético (PN) ANF aumenta la captación de noradrenalina (NA) en diversas áreas y núcleos del SNC (Neuroscience Letters 197,709-712, 1995). Como la familia de los PN comparten efectos fisiológicos, se estudió el efecto de los otros PN sobre la captación de NA como parámetro del metabolismo de las catecolaminas en las regiones telencefálicas, diencefálicas, mielencefálicas, protuberancial y en órganos circunventriculares obtenidos de acuerdo a la técnica de Palkovitz y Brownstein. Los experimentos se realizaron "in vitro". El BNP y el CNP aumentaron la captación de NA en todos los núcleos y áreas estudiadas (Control vs CNP y BNP respectivamente, dpm $\times 10^4/\text{mg prot} \pm \text{ESM}$). Bulbo Olfatorio ($2,1 \pm 0,1$; $5,7 \pm 0,2$; $6,7 \pm 0,7$), Núcleo periventricular ($3,1 \pm 0,4$; $6,1 \pm 1,3$; $6,9 \pm 0,5$), Núcleo paraventricular ($3,1 \pm 0,2$; $4,9 \pm 0,1$; $3,9 \pm 0,3$), Órgano subfornical ($2,9 \pm 0,1$; $6,6 \pm 0,7$; $6,0 \pm 0,2$), Núcleo supraóptico ($3,0 \pm 0,3$; $6,2 \pm 0,9$; $5,4 \pm 0,3$), Área postrema ($2,8 \pm 0,3$; $5,3 \pm 0,5$; $5,0 \pm 0,4$), Eminencia media ($1,9 \pm 0,2$; $2,9 \pm 0,1$; $2,8 \pm 0,2$), Núcleo arcuato ($2,5 \pm 0,2$; $4,1 \pm 0,3$; $4,0 \pm 0,3$). Se concluye que los PN actúan como neuromoduladores de estas regiones regulando indirectamente, a nivel de la neurona presináptica, procesos relacionados con la transmisión simpática, la actividad cardiovascular, la homeostasis hidrosalina y neurosecreciones.

333. Aumento del Factor Natriurético Atrial (ANF) plasmático en ratas Sprague-Dowley infectadas por *Tripanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Ana Puyó*, Jorge Scaglione., Horacio Dupuy., Miriam Postan#, Belisario Fernández.

*Cátedras de: *Biología Celular e Histología; -Fisiopatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. #Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatala Chabén, Buenos Aires.*

El aumento de la liberación de ANF por el corazón está relacionado con la sobrecarga hemodinámica y la hipertrofia cardíaca presentes en diferentes cardiopatías como la producida por *T. cruzi*. El objetivo de este estudio fue investigar el comportamiento del ANF plasmático durante la infección aguda (30 días) y crónica (180 días) producida por *T. cruzi* en ratas Sprague-Dowley. Los animales ($n=35$, edad 28 días) fueron inoculados intraperitonealmente con 10^6 tripomastigotes, derivados de piel y músculo embrionario, del clon Sylvio-X10/7 de *T. cruzi* (mortalidad 11 y 21 % respectivamente). Las ratas controles ($n=24$) fueron inoculadas con medio RPMI-1640. La sangre se obtuvo de los animales infectados (anestesiados) en los días 30 y 180 post-infección (p.i.). Ambos grupos ($n=17$ y $n=11$ respectivamente) fueron comparados con ratas controles ($n=10$ y $n=14$) en el mismo período p.i. El ANF plasmático se determinó por RIA, hallándose significativamente aumentado en ratas con infección aguda (348 ± 40 vs 195 ± 36 pg/ml, $p < 0,015$) y crónica (545 ± 81 vs 229 ± 38 pg/ml, $p < 0,001$) con respecto a sus controles. Las ratas con infección crónica mostraron niveles aumentados de ANF con respecto a los hallados en la fase aguda ($p < 0,025$). La morfología del tejido cardíaco (microscopía óptica) mostró evidencias de miocarditis aguda en la primera fase; mientras que en la crónica se evidenció fibrosis y atrofia de las fibras miocárdicas. En conclu-

sión, los niveles elevados de ANF plasmático, hallados en este estudio, reflejarían la respuesta inflamatoria de las células miocárdicas a la infección aguda por *T. cruzi*, tal como se ha observado en miocarditis de diferentes orígenes. Los niveles aún mayores presentes en las ratas con infección crónica derivarían de la inflamación y del deterioro progresivo de la función cardíaca, como consecuencia de la necrosis y fibrosis del miocardio hallado en el período terminal de la infección por *T. cruzi*.

334. La insulina potencia las contracciones por endotelina-1 en la arteria de la cola de rata. Alejandro Rebolledo, Gustavo Rinaldi, Verónica Milesi, Alicia Gómez Alvis, Angela Grassi de Gende

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

La insulina aumenta la producción de las sustancias vasoactivas óxido nítrico (NO), prostaciclina y endotelina, y estos efectos podrían modificar la respuesta a ET_1 en casos de hipertensión arterial asociada a resistencia insulínica. En aorta de rata comprobamos la atenuación de la contracción producida por ET_1 $0,01 \mu\text{M}$ al preincubar el tejido por 120 min con insulina $500 \mu\text{U/ml}$ (I_{500}) y un inhibidor de la síntesis de NO (L-NAME $0,1 \text{ mM}$), efecto mediado por un derivado del ácido araquidónico, posiblemente pro-taciclina, ya que fue suprimido por indometacina $10 \mu\text{M}$. Los presentes resultados analizan la respuesta de la arteria de la cola de la rata, midiendo fuerza isométrica (gFuerza/gPeso) en iguales condiciones que en la aorta. Utilizando el test de 't' para muestras apareadas se demostró que I_{500} aumenta la fuerza desarrollada por ET_1 con respecto al control (C), ($I_{500}\text{-C} = 251 \pm 103$; $n=28$, $p < 0,01$), mientras que en presencia de L-NAME no la modifica ($I_{500}\text{-C} = 0,44 \pm 102$; $n=28$, NS). Indometacina suprime el aumento de la contracción inducido por insulina ($I_{500}\text{-C} = 43 \pm 197$; $n=32$, NS) y no modifica la respuesta a ET_1 en presencia de L-NAME ($I_{500}\text{-C} = 107 \pm 171$; $n=32$, NS). Concluimos que en la arteria de la cola de la rata la preincubación con insulina potencia la contracción por ET_1 al incrementar la liberación y/o los efectos de un derivado del ácido araquidónico vasoconstrictor, posiblemente tromboxano A_2 , y que la presencia de NO es necesaria para que se manifieste este efecto de la insulina.

335. La endotelina-1 estimula la actividad del intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ independiente de Na^+ en el miocardio. María Camilión de Hurtado, Irene Ennis, Bernardo Alvarez, Horacio Cingolani

Centro de Investigaciones Cardiovasculares. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata.

Se ha demostrado que la endotelina-1 (ET-1) ejerce múltiples efectos sobre el miocardio: inotrópico positivo, acción hipertrofica y estimulación del intercambio Na^+/H^+ (NHE). En el curso de algunos experimentos se observó que cuando la ET-1 se aplicaba en presencia de bicarbonato no causaba el aumento de pH intracelular (pH_i) esperable por estimulación del NHE. Esta observación planteó la posibilidad de que ocurriese una estimulación simultánea de un mecanismo acidificante y dependiente de HCO_3^- , como lo es el intercambio de Cl^- por HCO_3^- independiente de Na^+ (AE). Dado que la recuperación del pH_i (rpH_i) luego de una sobrecarga alcalina es debida a la actividad del AE, en este trabajo se estudió el efecto de ET-1 (10 nmoles/L) sobre la velocidad de rpH_i en músculos papilares de gato cargados con BCECF. La sobrecarga alcalina se provocó por exposición a cloruro de trimetilamina (40 mmoles/L , 10 min). La velocidad de rpH_i aumentó de $0,027 \pm 0,003$ a $0,045 \pm 0,004$ ($P < 0,05$, $n=6$) luego de la exposición a ET-1, sin cambios en el pH_i basal ($7,14 \pm 0,04$). El aumento en la velocidad de rpH_i causado por ET-1 fue suprimido tanto por PD 142,893 (bloqueante no selectivo de receptores de ET) y por BQ 123 (antagonista selectivo de los receptores ET_A). Los resultados permiten concluir que ET-1 activa, a través de los receptores ET_A , la actividad del AE en el miocardio.

336. Efecto no calcémico del calcitriol sobre la presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas. Jorge Toblli, Cristina Nyberg

Laboratorio de Medicina Experimental. Hospital Alemán, Buenos Aires.

En pacientes hipertensos esenciales se ha comunicado niveles elevados de calcitriol (VD_3). El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de VD_3 en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y controles normotensos (WKY). Machos SHR y WKY de 12 semanas de edad se separaron en 4 grupos. G1 (n=20) SHR- VD_3 ; G2 (n=20) WKY- VD_3 ; G3 (n=20) SHR y G4 (n=20) WKY. G1 y G2 recibieron VD_3 200ng/100g rata/día, intraperitoneal, durante 2 semanas; G3 y G4 con equivalente volumen de vehículo. Los Gs. con alimento standard y agua común "ad libitum". Se determinó basal y fin 2da. semana: 1) calcemia $[Ca]_s$ (absorción atómica); 2) presión arterial sistólica (PAS) con rata conciente por "tail cuff". Se utilizó ANOVA y test de comparación múltiple de Tukey-Kramer, $\alpha=0,05$. Resultados 2da. Semana ($\bar{X} \pm DS$): 1) $[Ca]_s$ (mg/dl): G1 SHR- VD_3 $13,9 \pm 1,2^*$; G2 WKY- VD_3 $13,7 \pm 0,9^*$; G3 SHR $8,9 \pm 0,4$; G4 WKY $8,8 \pm 0,4$. $p < 0,01^*$ vs. G3 y G4. 2) PAS (mmHg): G1 SHR- VD_3 $190,9 \pm 4,6^*$; G2 WKY- VD_3 $133,9 \pm 6,4^{**}$; G3 SHR $158,3 \pm 5,2$; G4 WKY $114,8 \pm 2,1$. $p < 0,01^*$ vs. todos y ** vs. todos. Correlación lineal (Pearson) entre PAS y $[Ca]_s$: 1) en SHR- VD_3 ($r=0,09041$, $p=0,7046$) y 2) en WKY- VD_3 ($r=0,01574$, $p=0,9475$). Conclusiones: a) Los Gs. que recibieron VD_3 presentaron cifras significativamente mayores de PAS; b) la falta de correlación entre PAS y $[Ca]_s$ sugiere un mecanismo no calcémico para explicar el efecto de VD_3 sobre la presión arterial.

337. Efecto del meloxicam sobre los niveles de fibrinógeno en ratas con injurias múltiples. Mónica Moya, Vilma Campana, Antonio Gavotto, Luis Spitala, Juan Simes, José Palma.

Cátedra de Física Biomédica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.

Grupos de ratas fueron sometidas a injurias múltiples para estudiar las posibles variaciones de fibrinógeno y la regresión de las lesiones anatomopatológicas (AP) de aorta al tratarlas con meloxicam. Las injurias se realizaron por dos laparotomías en 8 días y 4 en 30 días. Se inyectó 0.065 mg/Kg/rata por vía intramuscular de meloxicam, inmediatamente después de la 3ª cirugía y durante 10 días. La sangre se obtuvo a las 72 hs de la última injuria. Fibrinógeno se dosó por espectrofotometría. Los resultados se analizaron estadísticamente con ANOVA, la comparación múltiple se realizó por el test de REGWQ. AP se analizó por Chi-Square, estableciendo un nivel de significación de $p < 0,05$. Se observó un incremento estadísticamente significativo de fibrinógeno entre el lote control (a) ($208,7 \pm 6,0$) y los animales doblemente injuriados (b) ($321,9 \pm 12,9$) e injuriados múltiples (c) ($282,0 \pm 9,5$) ($p < 0,001$); no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de fibrinógeno del grupo (a) y de los injuriados tratados con meloxicam (d) ($198 \pm 8,7$). Existe diferencia significativa entre el grupo (b) y (c) ambos comparados con el (d) ($p < 0,001$) manteniéndose la denudación endotelial y el engrosamiento de la íntima aórtica. La disminución del fibrinógeno en el lote tratado con meloxicam se debería a la inhibición de Cox-2.

338. Participación del calcio intracelular y del NO en la modificación de las contracciones por endotelina (ET_1) debida a preincubación con insulina. Alejandro Rebolledo, Alicia Gómez Alvis, Verónica Milesi, Gustavo Rinaldi, Angela Grassi de Gende

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

La interacción de los efectos de insulina y ET_1 sobre la contracción vascular puede estar asociada a la presentación de hiperinsulinemia e hipertensión arterial. Demostramos previamente que en aorta de rata la preincubación por 120 min. con insulina 500 $\mu U/ml$ (I_{500}) potencia la velocidad de desarrollo de la contracción por ET_1 0,01 μM (disminución del $t_{1/2}$) tanto sin como con in-

hibición de la síntesis del NO con L-NAME. En presencia de rianodina 10 μM la preincubación con I_{500} no modifica el $t_{1/2}$, sugiriendo que el aumento de la velocidad de contracción por ET_1 producido por I_{500} podría estar mediado por la liberación de Ca^{2+} intracelular. Trabajando en ausencia de Ca^{2+} externo (5 min. de exposición previa a Ringer- $0Ca^{2+}$ -0,2 mM de EGTA), investigamos en este trabajo la participación de los depósitos internos de Ca^{2+} en la modificación que produce la I_{500} sobre la contracción por ET_1 0,01 μM en presencia y en ausencia de L-NAME. La preincubación con I_{500} disminuyó el $t_{1/2}$ (control: 467 ± 68 vs I_{500} : 213 ± 28 s; $n=16$, $p < 0,01$, test de 't' con muestras indep.). En Ringer- $0Ca^{2+}$, al inhibir la síntesis de NO con L-NAME 0,1 mM no se observaron efectos de la I_{500} sobre el $t_{1/2}$ (control: 223 ± 25 vs I_{500} : 181 ± 27 s; $n=16$, NS). Estos resultados muestran que el efecto de la preincubación con I_{500} aumenta la velocidad de contracción por ET_1 al estimular la liberación de Ca^{2+} interno por el retículo sarcoplásmico, antagonizando el efecto inhibitorio que el NO tendría sobre este mecanismo.

339. Contribución del Retículo Sarcoplásmico (RS) a la relajación del músculo liso vascular. Matilde Said, Gustavo Rinaldi, Cecilia Mundiña, Leticia Vittone, Gladys Chiappe, Alicia Mattiazzi.

Centro de Investigaciones Cardiovasculares. Facultad de Ciencias Médicas. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

En la relajación del músculo liso vascular producida por agentes que aumentan el GMPc y el AMPc están involucrados diversos mecanismos. Se realizaron experimentos para estudiar la participación del RS y de la fosforilación de PHL, proteína reguladora de la bomba de Ca^{2+} del RS (SERCA2), en el efecto relajante del nitroprusiato de sodio (NP) y del forskolin (FK). 100 μM NP y 50 μM FK fueron administrados a tiras de aortas de gato previamente contracturadas con CIK 80 mM. La fosforilación de Ser¹⁶ fue detectada por inmunoanálisis con anticuerpos específicos para PHL fosforilada en ese sitio. NP y FK produjeron un efecto relajante que estuvo asociado con un aumento de la fosforilación del residuo Ser¹⁶ de PHL de $144 \pm 42\%$ (NP) y $105 \pm 16\%$ (FK) respecto al control ($P < 0,05$) y que disminuyó significativamente con el inhibidor de SERCA2 thapsigargin (1 μM) en $23 \pm 9\%$ (NP) y $36 \pm 9\%$ (FK). Los resultados indican que en aorta de gato el RS es responsable de una fracción (aproximadamente un tercio) del efecto relajante inducido por NP y FK. Ambos efectos están asociados a un aumento de la fosforilación del residuo Ser¹⁶ de PHL.

340. Efecto proarrítmico de una sulfonilurea de segunda generación durante la reperusión temprana en ovejas conscientes sometidas a isquemia reversible. Héctor del Valle, Jorge Negroni, Elena Lascano, Alberto Crottogini

Universidad Favaloro. Buenos Aires.

La glibenclamida (Gli), utilizada en la práctica clínica como hipoglucemiante oral, es un conocido bloqueante de los canales de potasio dependientes de ATP. Por su acción similar grupo III (disminución del eflujo de potasio y atenuación del acortamiento del período refractario) ha sido considerada como droga potencialmente antiarrítmica. Sin embargo, los efectos que esta sulfonilurea tiene en la prevención de las arritmias inducidas por isquemia son contradictorios, en tanto que además, se ha asociado a este grupo de drogas con un aumento de la mortalidad por causa cardiovascular en pacientes diabéticos. En el presente trabajo se evaluó la presencia de arritmias graves: taquicardia ventricular (TV) y fibrilación ventricular (FV) en ovejas conscientes sometidas a 12 minutos de isquemia en situaciones control (C, n=13) y tratadas con Gli intravenosa (0.4 mg/Kg de peso; dosis máxima total de 12 mg) 30 minutos antes de iniciar la oclusión (Gli, n=11). Los resultados arrojaron un marcado efecto proarrítmico de la droga en cuanto a la aparición de TV (90,9% Gli vs 30,8% C; $\chi^2 p < 0,025$) y FV (81,8% Gli vs 30,8% C; $\chi^2 p < 0,05$). Con-

clusiones: este trabajo demuestra, en clara contraposición al resultado esencialmente antiarrítmico obtenido en corazón aislado y animal anestesiado, que la administración de Gli exacerba la aparición de arritmias graves (TV y FV) durante la reperfusión temprana en animales conscientes.

INMUNOLOGIA

341. Expresión antigénica en el carcinoma de cabeza y cuello.

María Croce; Adrián Pereyra; Daniel Fioravanti; Martín Rabassa, Amada Segal-Eiras

Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata.

En el presente trabajo se analizó la inmunoreactividad de antígenos tumorales tales como MUC1, MUC5B, MUC7, mucina oral gp230, Lewis x, sialil Lewis x, Lewis y, Tn y citoqueratinas en tejidos neoplásicos y normales de cabeza y cuello. Los tumores fueron clasificados según su localización y estadio. Por inmunohistoquímica, se realizó un estudio comparativo con calentamiento de las muestras a 100 °C durante 5 min y sin calentamiento, aumentando la expresión antigénica con la temperatura. Los resultados demostraron que el 100% de los tumores expresó MUC1; Tn mostró reacción positiva en todos los tumores a excepción de los localizados en trigono retromalar, mientras que Lewis x fue negativo en la localización citada y en lengua. Tanto el sialil Lewis x como Lewis y fueron expresados en los tumores de lengua siendo negativos para los antígenos restantes. Los tejidos normales mostraron expresión del Lewis y mientras que Tn, Lewis x y sialil Lewis x reaccionaron en una sola muestra. En los tejidos normales, la reacción positiva se observó circunscrita a las capas más profundas de la mucosa, siendo opuesta a la inmunoreactividad difusa observada en los tumores. Conclusión: La expresión de MUC1 y de antígenos hidrocarbonados en estos tumores constituyen un hallazgo original y podría ser un nuevo modelo para blanco de inmunoterapia.

342. Purificación y caracterización bioquímica parcial de una galectina-1 de bazo porcino.

María Elola[#], María Iglesias^{*}, Carlota Wolfenstein-Todel^{*}, Nilda Fink[#].

[#] Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. ^{*} Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Las galectinas son lectinas animales que se caracterizan por su especificidad para sacaridos de configuración β -galactosídica y por poseer secuencias consenso en el dominio que liga carbohidratos. El objetivo del presente trabajo fue el aislamiento y caracterización de una galectina esplénica porcina. La purificación de la lectina se obtuvo mediante cromatografías de intercambio iónico y de afinidad. La pureza de la proteína se evaluó mediante electroforesis en PAGE-SDS, capilar, y en exclusión molecular (FPLC). La galectina resultó ser un homodímero con subunidades de 14 kDa y un peso molecular nativo de 32 kDa. La molécula presentó actividad aglutinante de glóbulos rojos de conejo tratados con neuraminidasa y fijados con glutaraldehído. En ensayos de inhibición de la aglutinación por azúcares, se demostró la especificidad de esta galectina por sacaridos β -galactosídicos como la lactosa y el tiodigalactósido. Se efectuó la digestión con tripsina de la lectina y posterior separación de los péptidos en HPLC de fase reversa, secuenciándose el 30% de la molécula que incluye el dominio de unión a carbohidratos. En estudios de reactividad cruzada en Western blot, se demostró que la galectina de bazo porcino comparte epitopes con la galectina-1 esplénica humana. Los resultados obtenidos permiten afirmar que la lectina purificada pertenece a las galectinas de tipo 1.

343. La toxina colérica como inmunomodulador en la respuesta humoral dirigida hacia antígenos de *Vibrio cholerae*.

nández Miyakawa Mariano, Deluchi Silvana, Mateo Nancy, Brero María Luisa

Centro Nacional de Control de Calidad de Biológicos. ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires.

La toxina colérica (CT) potencia la respuesta inmune hacia antígenos proteicos. El principal antígeno de superficie de *Vibrio cholerae* es LPS, que posee propiedades inmunomodulantes. En este trabajo se estudió el efecto de la CT sobre la respuesta humoral dirigida hacia antígenos de superficie, LPS y proteínas de membrana externa (OMP), y la actividad bactericida en sueros murinos. Grupos de 10 ratones NIH fueron inoculados, en 3 oportunidades, con 10^8 vibrios recombinantes (ctxA-) viables, con o sin CT, por vía ip y se midieron por ELISA los niveles de Ig G e Ig M en sueros individuales obtenidos a diferentes tiempos en un lapso de 12 meses. Los resultados muestran un efecto estimulante de la toxina sobre los niveles séricos de IgM (97 ± 15 vs 375 ± 3 $p < 0,05$) e IgG (1518 ± 350 vs 3824 ± 465 $p < 0,05$) anti LPS e IgM (3000 ± 456 vs 10250 ± 565 $p < 0,02$) anti OMP y la actividad bactericida (8600 ± 1090 vs 18550 ± 2250 $p < 0,01$) comparados luego del día 7 del segundo booster. Nueve meses más tarde se observaron títulos IgM anti LPS ($p < 0,02$) y actividad bactericida ($p < 0,02$) mayores en el tratamiento con CT. Se observó un marcado efecto de CT una semana después del primer (35 veces) y segundo booster (19 veces) sobre IgM anti LPS, con títulos que se mantuvieron en el tiempo. La toxina magnificó la generación y persistencia temporal de títulos Ig M anti LPS y la actividad bactericida en los sueros de los animales tratados. Los resultados indican que CT indujo una fuerte respuesta secundaria hacia LPS con altos niveles de IgM.

344. Determinación de anticuerpos anti-rH Ro/SSA 52 y 60 kDa en pacientes con Síndrome de Sjögren.

Gonzalez-Maglio, Daniel; Squiquera, Luis; Abatangelo, Carmen; Miguel, Silvia; Fonseca, María y Leoni, Juliana.

Cátedra de Inmunología, Facultad Farmacia y Bioquímica. IDEHU CONICET, Universidad de Buenos Aires. Sección Reumatología, Hospital Rivadavia

Los pacientes con Síndrome de Sjögren (SS) presentan anticuerpos contra componentes de 52 y 60 kDa del autoantígeno Ro. Los mismos anticuerpos también se detectan en lupus eritematoso sistémico, subagudo y neonatal. Se estudiaron los sueros de 20 pacientes con SS primario que cumplían los criterios de la ARA. La presencia de anti Ro52 y 60 kDa se determinó mediante inmunoblot (WB) usando proteínas recombinantes. Los insertos con las secuencias Ro60 y Ro52 fueron clonados en pET. Las proteínas recombinantes se expresaron en lisógenos DE3 en E. coli BL21 (DE3). Los controles se obtuvieron del Centro de Control de Enfermedades, CDC (Atlanta, USA). Mediante inmunoprecipitación (IP) 55% (n=11) de los pacientes fue Ro+ y 40% (n= 8) La+. A través de WB el 70% (n=14) fue Ro52+, en tanto que Ro60 fue reconocido por 50% (n=10) de los casos. El 20% (n=4) de los Ro+ presentaron únicamente anticuerpos anti-Ro/SS-A52 y el 15% (n=3) anti Ro/SS-A 60. La incidencia de estos anticuerpos varía según el método utilizado para su detección con respecto al método habitual de IP. En este trabajo utilizamos además ELISA y WB y nuestros hallazgos demuestran la existencia de anticuerpos anti Ro60 en 50% de SS. La determinación de anti-Ro52 en WB es 22% mayor que la detección de Ro total mediante inmunoprecipitación. WB es una metodología que no es aceptada ampliamente en el diagnóstico serológico. Nuestro objetivo fue realizar una correlación clínico-serológica comparativa de las dos metodologías WB e IP.

345. Estallido respiratorio de leucocitos sanguíneos y de mini-BAL en pacientes sépticos con distrés respiratorio agudo.

Néstor Pistillo, Cecilia Fornari, Abel Cárdenas, Teresa Guereño, Martín Repetto, Roberto Diez.

Terapia Intensiva Hospital Fiorito, Avellaneda, Laboratorio de Inmunofarmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

El daño pulmonar durante el distrés respiratorio agudo en sepsis es atribuido a la activación leucocitaria excesiva e inapropiada dentro del pulmón. En estudios previos mostramos que el estallido respiratorio de los leucocitos sanguíneos en sepsis, al momento de ser ésta diagnosticada, está disminuido. El objetivo de este trabajo fue evaluar simultáneamente la actividad de estallido respiratorio en neutrófilos sanguíneos y leucocitos obtenidos por mini-BAL en pacientes sépticos con distrés respiratorio agudo, en distintos momentos de la evolución del mismo (desde el diagnóstico hasta 7 días). Sepsis y distrés respiratorio agudo fueron definidos en base al Consensus (1992) y al Consenso Americano-Europeo sobre SDR (1994), respectivamente. El estallido se midió por citometría de flujo, por oxidación de diacetato de diclorofluoresceína. Se estudiaron 19 pacientes en asistencia respiratoria mecánica, con *score* de APACHE entre 8 y 25, y Marchall entre 7 y 15. Los valores de estallido respiratorio en sangre (214 ± 75 UA) y en BAL (2198 ± 1148) fueron extremadamente heterogéneos. Como tendencia, los valores más altos se encontraron en BAL en los momentos iniciales y los más bajos, en sangre al inicio. Sin embargo, no hubo correlación significativa entre ambos ($r = -0,38$, $p > 0,05$). Aunque el resultado puede estar influido por el número y heterogeneidad de los pacientes, es probable que factores adicionales, además de la actividad oxidativa de los neutrófilos, sean determinantes del desarrollo de distrés respiratorio.

346. Detección de anticuerpos circulantes anti-Hsp 27 (proteína del shock térmico) en pacientes con cáncer de mama.

Graciela Laguens, Silvia Coronato, Osvaldo Spinelli, Jorge Chambó, Wanda Di Girolamo

Cátedra de Patología B. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata.

La Hsp 27 (proteína del shock térmico 27) es una fosfoproteína cuya sobreexpresión en el cáncer de mama está correlacionada con una disminución de la sobrevida. En estudios anteriores, habíamos detectado su presencia por medio de Western blot en los homogenatos de ganglios linfáticos regionales (GLR) libres de metástasis de pacientes con cáncer de mama; y por medio de inmunohistoquímica en células presentadoras de antígenos (macrófagos y células foliculares dendríticas) de los mismos ganglios. Estos hallazgos nos indujeron a pensar que la Hsp 27 podría comportarse como un antígeno tumoral capaz de ser transportado a los (GLR) y allí desarrollar una respuesta inmune. El propósito de este trabajo fue investigar si el suero de pacientes con cáncer de mama presentaba anticuerpos contra esta proteína. Para ello se utilizó la técnica de Elisa en 23 sueros de pacientes con cáncer de mama en distintos estadios anatomoclínicos y en 19 sueros controles. En 17/23 (74%) de los sueros de cáncer de mama se identificaron anticuerpos circulantes anti-Hsp 27. Los sueros controles fueron negativos en su mayoría 1/19. La presencia de anticuerpos anti-Hsp 27 se correlacionó significativamente con el estadio avanzado de la enfermedad (89%). Nuestros resultados sugieren que: La Hsp 27 puede comportarse como un antígeno tumoral o como un "carrier" del mismo en el cáncer de mama. Es transportada a los (GLR) donde induce una respuesta inmune humoral. La presencia de anticuerpos anti-Hsp 27 en el suero de pacientes con cáncer de mama podrían considerarse un marcador de mal pronóstico.

347. Detección y aislamiento de mucina epitelial de tipo 1 (muc1) en cancer de laringe. María Croce, Mike Price, A Segal-Eiras

Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, Cancer Research Laboratory, Nottingham University, UK.

El presente trabajo fue realizado con los siguientes objetivos: (1) estudiar la expresión de MUC1 y antígenos relacionados en cáncer de laringe y (2) establecer una metodología para el aislamiento de dicha mucina a partir de tejidos tumorales. El estudio

fue realizado en muestras tisulares de carcinoma epitelial de laringe que fueron procesadas para (1) inmunohistoquímica y (2) separación de fracciones subcelulares por ultracentrifugación con obtención de membranas extranucleares (ENM), posteriormente fraccionadas mediante centrifugación en gradientes de densidad en CICs/guanidina 4M y analizadas por SDS-PAGE y Western-blotting. El panel de anticuerpos monoclonales (MAbs) incluyó: anti-MUC1, anti Lewis x, anti-sialil Lewis x, anti Lewis y, anti MUC5B, anti mucina oral (gp230), anti Tn, anti p53 y anticitoqueratinas. Por inmunohistoquímica, se obtuvieron reacciones fuertemente positivas en la membrana plasmática y citoplasma con los siguientes MAbs: anti MUC1, anti Lewis x y anti Lewis y, mientras que con anti sialyl Lewis x y Tn sólo se observó reacción débil. En una fracción derivada de ENM y obtenida por centrifugación en CICs se detectó MUC1 mediante Westernblot. Conclusiones: (1) la expresión antigénica del cáncer de laringe consistió en MUC1, Lewis x y Lewis y y (2) la metodología fue útil para la obtención de MUC1 de muestras tumorales.

348. Caracterización inmunohistoquímica de subpoblaciones celulares de una línea de adenocarcinoma de pulmon (A549). María Croce, Andrea Colussi, Mike Price, Amada Segal-Eiras

Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata; Cancer Research Laboratory, Nottingham University, UK.

Con el objeto de analizar la heterogeneidad antigénica de la línea A549 se investigó su inmunorreactividad y la de cuatro subpoblaciones celulares obtenidas de la línea parental. Se empleó la técnica de separación celular en gradientes de Percoll y posterior cultivo de las subpoblaciones. El análisis inmunohistoquímico fue realizado con diversos anticuerpos monoclonales (MAbs): MUC1 (C595, HMF1 y HMF2); MUC5B (PANH2); gp230 (PANH4); los antígenos carbohidratos incluyeron sialil Lewis x (KM93), antígeno Tn (83D4), Lewis y (C14); citoqueratinas 5,6,8,17 y 19 y p53. Los resultados demostraron que la línea A549 parental así como la subpoblación D presentan una elevada y similar expresión de MUC1 y antígenos hidrocarbonados tales como el antígeno Tn, sialil Lewis x (relacionados con los procesos de metástasis), MUC5B y gp230; por su parte la reactividad del Lewis y (asociado con apoptosis) fue muy intensa en ambas poblaciones celulares. Respecto a la expresión de citoqueratinas y p53, la subpoblación D mostró una reactividad menor respecto a la línea original. En cambio, las subpoblaciones A, B y C presentaron un perfil antigenico opuesto al de la subpoblación D. Los resultados obtenidos con el panel de MAbs empleado nos permiten comprobar la heterogeneidad de la línea A549 constituyendo un blanco de elevado interés para la investigación en Oncoinmunología.

349. Dinamica de la expresion antigenica en una línea de adenocarcinoma de pulmon (A549). María Croce, Andrea Colussi, Mike Price, Amada Segal-Eiras

Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata; Cancer Research Laboratory, Nottingham University, UK.

La expresión antigénica de una línea tumoral establecida puede modificarse con el tiempo. Nuestro objetivo es analizar la dinámica de la expresión de antígenos tumorales en la línea A549. Se estudiaron los cultivos a los 2, 7, 14 y 21 días postconfluencia utilizando RPMI 1640, 10% SBF que fue renovado cada 3 días. Mediante inmunohistoquímica se evaluó la intensidad de reacción en porcentajes de células positivas empleándose anticuerpos monoclonales para detectar: mucinas epiteliales: MUC1, MUC5B, mucina oral gp230, MUC5AC; citoqueratinas (CK); p53; sialil Lewis x, Lewis y, Tn y antígeno carcinoembrionario (CEA). MUC5AC se expresa en un 50% en el día 2 incrementándose en los días 7 y 14 y declinando en el día 21 (25%). MUC1 y MUC5B dieron reacción positiva en el 15% en el día 2, descendió en el día 7 y se elevó a los 14 y 21

días, sin alcanzar la expresión del día 2. Lewis y mostró un comportamiento similar si bien la reacción de los días 14 y 21 fue mayor del 50%. CK, sialil Lewis x y Tn mostraron un incremento sostenido hacia el día 21, observándose lo inverso en la expresión de CEA. La expresión del p53 y gp230 fue positiva sólo a los 2 días. Conclusión: En este modelo, se observó una expresión variable de los antígenos estudiados durante el período de cultivo considerado posiblemente imputable a la heterogeneidad de la línea.

350. Efecto del inmunomodulador Timomodulina (TmB) sobre células TNF α + de vellosidad intestinal de ratas inmunodeficientes. Sofía Olmos, Gabriela Márquez, Estela Roux

Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Estudios previos en ratas Wistar - alimentadas al destete con dieta libre de proteínas durante 15 días y realimentadas con dieta de caseína al 20% durante 21 días, con TmB (R21-TmB) o sin TmB (R21) en el agua de beber - demostraron que el TmB normalizaba el número aumentado de células T CD8 α / α +; CD25+; γ δ + del intraepitelio (IE) y de las γ δ + de la lámina propia (LP) intestinal (The Immunologist, suppl 1, 1998). Objetivo: estudiar 1) la presencia de células TNF α + en LP e IE intestinal de ratas R21 respecto de los controles de igual edad (C60) y 2) el efecto del TmB sobre dichas células (R21-TmB). Se utilizaron cortes seriados de intestino procesados por la técnica de Sainte-Marie caracterizándose las células TNF α + por inmunohistoquímica. Resultados: número absoluto de células TNF α + en 30 campos, (X \pm ES) n=12, C60 vs R21 vs R21-TmB: 1) LP: 201.2 \pm 9.4 vs 222.17 \pm 8.7 vs 182.1 \pm 8.5, p<0.01 (Tukey-Kramer); 2) IE: 33.4 \pm 2.7 vs 46.8 \pm 2.4 vs 21.0 \pm 1.9, p<0.01 (Tukey-Kramer). Conclusión: el aumento de células TNF α + tanto en LP como en IE se normaliza por la administración oral del TmB durante el período de renutrición. Esto indica que el TmB ejerce una acción terapéutica a nivel del IE y LP intestinal, puesto que induce una disminución de las células T activadas (CD25) y de las células TNF α +. (Financiado por CONICET PIP 4147 y UBA TB72).

351. Subpoblaciones de linfocitos T en el tejido linfoide asociado a nasofaringe de ratas Wistar en crecimiento. Gustavo Sosa, Estela Roux.

Laboratorio de Inmunología Celular. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar los linfocitos T CD5+ y sus subclases CD4+, CD8 α +, CD8 α β +, TCR α β + y TCR γ δ + en el tejido linfoide asociado a nasofaringe (NALT) de ratas Wistar de 21, 45 y 60 días de edad. El tejido fue procesado por la técnica de Sainte-Marie y la caracterización fenotípica se realizó por inmunohistoquímica sobre cortes seriados del tracto respiratorio superior. Resultados (X \pm E.S., n=5, 21 vs 45 vs 60): 1) el número de células T CD5+ aumenta con la edad (72,0 \pm 3,5 vs 81,3 \pm 6,8 vs 106,8 \pm 8,0, p=n.s., ANOVA) pero las subclases CD4+, CD8 α +/CD8 α β + aumentan en número desde el destete hasta los 45 días de edad y luego se mantienen o disminuyen: (CD4: 26,5 \pm 4,6 vs 52,2 \pm 6,6 vs 49,8 \pm 5,9, p<0,05; CD8 α : 36,2 \pm 1,5 vs 53,5 \pm 3,5 vs 43,5 \pm 5,2, p<0,05; CD8 α β : 25,0 \pm 2,1 vs 51,0 \pm 5,8 vs 35,8 \pm 4,6, p<0,05, Tukey-Kramer); 2) las relaciones CD8 totales/ CD4 (2,7 vs 2,1 vs 1,6) y TCR γ δ / TCR α β (1,2 vs 1,1 vs 0,9)son altas al destete y disminuyen con la edad. Conclusiones: a) al destete hay predominio de los linfocitos T CD8 totales (CD8 α + CD8 α β) respecto de los CD4, que se mantiene hasta los 60 días de edad; b) la relación TCR γ δ / TCR α β , predominante al destete, se invierte a los 60 días. El predominio de linfocitos CD8+ y TCR γ δ + en un estadio temprano del desarrollo (destete) sugiere su papel en favorecer la vigilancia inmunológica en el tracto respiratorio superior (Financiado por CONICET PIP 4147 y UBA TB72).

352. Regulación de la respuesta aloinmune en el hipotiroidismo experimental. Alicia Klecha, Ana Genaro, Alexis Lysioneck, Gabriela Gorelik, Ricardo Caro, Graciela Cremaschi

CEFAYBO-CONICET y Laboratorio Metodología de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Previamente comprobamos la modulación positiva de una respuesta aloinmune por la acción de hormonas tiroideas, específicamente tiroxina (T4). Se profundizó en la interacción entre el eje tiroideo y el sistema inmune analizando los efectos del hipotiroidismo inducido por tratamiento de ratones BALB/c (H-2^d) con propiltiouracilo (PTU), sobre una respuesta aloinmune *in vivo* e *in vitro*. El PTU indujo una disminución en el título de aloanticuerpos, que fue máxima en la primer semana post-inmunización (título citotóxico Control (C): 1/2; tratados con T4: 1/40; tratados con PTU: no detectable, n = 4, p<0.01). Por otra parte, se estudió la proliferación linfocitaria de células provenientes de animales PTU, C y T4 inducida por un estímulo alogénico (células linfocíticas C3H) *in vitro* en un cultivo mixto linfocitario unidireccional. Se comprobó que el índice de estimulación (IS) de células linfocíticas de animales PTU no difería significativamente al obtenido con linfocitos C pero estaba disminuido en animales T4 (IS al 6to día de cultivo: C: 4.20 \pm 0.21; T4: 7.68 \pm 0.06; PTU: 3.71 \pm 0.16", * difiere de C con p<0.05, ** difiere de T4 con p<0.01). Los dosajes de hormonas tiroideas hallados en los grupos de animales fueron coincidentes con los tratamientos realizados. Se concluye que las hormonas tiroideas son capaces de regular la respuesta aloinmune dependiendo de sus niveles circulantes. Estos resultados puntualizan en la existencia de un circuito de control entre el eje tiroideo y el sistema inmune.

353. Disminución de la relación CD4/CD8 en el timo de los ratones mutantes nact: rol del epitelio tímico. Virginia Francisco, Gabriela Lombardi, Paula Berguer, Pedro Bekinschtein, Julián De Almeida, María Schiatti, Isabel Piazzon, Christiane Pasqualini, Irene Nepomnaschy.

Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.

Los ratones mutantes nact (n/n) presentan una importante disminución en el porcentaje de células y el número absoluto de células CD4+ y aumentos en la subpoblación CD8+ en el timo con respecto a sus hermanos heterocigotas para la mutación (n/+) lo que determina una modificación en la relación CD4/CD8: n/n= 1.23 \pm 0.63(11) vs n/+ = 3.69 \pm 0.87(12) p<0.0001 (media de la relación CD4/CD8 \pm DS (número de animales)). Se transplantaron en ratones nude timos de embriones n/n y n/+ de 19 días tratados con deoxiguanosina. Un mes más tarde se investigó por citofluorometría el porcentaje de células CD4+ y CD8+ en los timos trasplantados. La relación CD4/CD8 fue de: 1.11 \pm 0.24 (6) (n/n) vs 3.18 \pm 1.19 (3) (n/+) p<0.05. Estos valores no difieren de los observados en los timos de los ratones n/n y n/+ respectivamente. No se observaron diferencias significativas en la expresión de los antígenos mayores de histocompatibilidad de clase I y II en el epitelio tímico. Estos resultados indican que el epitelio tímico interviene en la alteración de la relación CD4/CD8 que caracteriza a los mutantes nact, independientemente de la expresión de los antígenos mayores de histocompatibilidad.

354. Participación de la vía L-arginina-óxido nítrico (NO) en la patogenia del síndrome urémico hemolítico (SUH) en un modelo murino. Graciela Dranš, Gabriela Fernández*, Carolina Rubel*, Emilse Bermejo*, Sonia Gómez*, Martín Isturiz*, Marina Palermo*

**Div. de Inmunología y *Hemostasia y Trombosis, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.*

El daño endotelial contribuye a la patogenicidad del SUH. Dado que el NO es una importante molécula reguladora de la función endotelial, nuestro objetivo fue estudiar su rol en el modelo murino de SUH inducido por inyección de Shiga-toxina 2 (Stx). El tratamiento con Stx aumentó la concentración sérica de NO, mientras

que la administración previa de L-NAME, inhibidor de la NO sintasa (NOS), previno este aumento (NO_2^- μM : basal: $5,06 \pm 1,12$; Stx: $9,39 \pm 3,06$, $n=6$; $p<0,05$; L-NAME+ Stx: $5,22 \pm 2,27$). El efecto del NO sobre la toxicidad de la Stx se evaluó a través de la mortalidad y la uremia. El L-NAME aumentó significativamente ambos parámetros, siendo los porcentajes de mortalidad Stx: $49,33 \pm 15,9$ y Stx+L-NAME: $69,77 \pm 22$, $n=25$ y la uremia (mg%) Stx: 114 ± 41 y Stx+L-NAME: 338 ± 60 ; $n=15$, ($p<0,01$). La aminoguanidina, inhibidor de la NOS inducible, no tuvo efecto, sugiriendo la participación preferencial de la NOS constitutiva. Considerando que la formación de trombos participa en el daño endotelial durante el SUH y que el NO es inhibidor plaquetario, se evaluó la función plaquetaria. Las plaquetas de animales con Stx mostraron una mayor activación que aquéllas de animales controles (control: 100%; Stx: $139 \pm 42\%$, $n=13$; $p<0,01$). En el grupo L-NAME+Stx no se observó hiperactivación plaquetaria con respecto al grupo con Stx. Concluimos que la Stx induce la producción de NO, y que la inhibición de ésta por L-NAME exacerba el daño por Stx. La Stx induce la hiperactivación plaquetaria, aunque, no está claro de qué manera el L-NAME aumenta la toxicidad de la Stx.

355. La inducción de receptores para glucocorticoides por IL-1 β abre la posibilidad de tratamiento con corticoides en el shock séptico experimental inducido por lipopolisacáridos (LPS) *E.coli* O111. Fernanda Alves Rosa, Luis Mari, Gabriela Fernández, Paula Barrionuevo, Marina Palermo, Martín Isturiz.

División Inmunología. Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires.

La tolerancia a LPS es un mecanismo activo inducido por la inoculación sucesiva de dosis bajas de LPS que confiere protección al shock séptico experimental inducido por una dosis letal de LPS (200 μg). Observamos que la IL-1 toleriza a LPS en forma dosis dependiente en ratones BALB/c; los porcentajes de sobrevida fueron: salina: 0% ; IL-1 β 10 ng: 0%, IL-1 β 100ng 75 % ($p<0,01$ $n=12$, Test de Fisher). Si bien IL-1 β 100ng induce la secreción de glucocorticoides, estos últimos son incapaces *per se* de inducir tolerancia. Así, dexametasona (DEXA) 2,5 mg/Kg.: 0%. No obstante, IL-1 β 10ng (dosis no inductora de glucocorticoides) inyectada 2hs. antes de DEXA aumentó la sobrevida: 67% ($p<0,01$, $n=12$, Test de Fisher). Dado que la IL-1 β favorece la acción de la DEXA en la inducción de tolerancia, el objetivo siguiente fue investigar los mecanismos por los cuales se opera tal fenómeno. Así, se evaluó la capacidad de la IL-1 β de aumentar los niveles de receptores para glucocorticoides en macrófagos peritoneales murinos. Estas células fueron cultivadas en medio RPMI 1% SFB (3×10^6 /pozo) y tratadas con medio o IL-1 β (10ng) durante 24hs. Luego, se determinó la unión específica de ^3H -DEXA y los resultados fueron los siguientes: control: 4.3 ± 1.1 pmoles vs. IL-1 β : 5.9 ± 1.4 pmoles ($p<0,05$, $n=5$, Test pareado). Se concluye que la acción de IL-1 β en la tolerancia a LPS, reside en su capacidad de aumentar los niveles de receptores para glucocorticoides para que estos ejerzan su efecto en la inhibición del shock séptico.

356. PCR-SSO del locus HLA-C en diversas poblaciones de la República Argentina: aspectos evolutivos. Paula Barrionuevo, Graciela Theiler, Leonardo Satz, Leonardo Fainboim

Laboratorio de Inmunogenética. Hospital de Clínicas. Universidad de Buenos Aires.

Se utilizó PCR-SSO para determinar la distribución y frecuencia de los alelos HLA-C en tres poblaciones indígenas argentinas: Mapuches (Map, $n=90$), Chiriguano (Chi, $n=50$) y Wichis (Wi, $n=16$), y una población caucásica sana de la ciudad de Buenos Aires (Cau, $n=30$). En Map se detectaron 25 alelos, 56,67% de los individuos presentó el Cw*0702, seguido por el *0401 (24,44%) y el *0701 (17,78%). En Chi se encontraron 16 alelos, predominando el *0401 (44%) y el *03041 (42%). En Wi se encontraron 7 alelos, 50% presentó el *0303 y 31,25% el *0401. En Cau se

encontraron 21 alelos, 23,33% presentó el *0401, 20% el *0701 y 20% el *0702. El test de neutralidad de Ewens-Watterson para las 4 poblaciones mostró que el estadístico de homocigosis no difiere del esperado en condiciones de neutralidad. Se construyeron fenogramas a partir de las frecuencias alélicas del locus C para las poblaciones estudiadas y otras 17. En los mismos se observaron dos grupos bien definidos, uno conteniendo a los indígenas americanos (excepto Map) y las poblaciones del noreste asiático, y el otro a los caucásicos, poblaciones africanas y los Map. En resumen, los Map presentan una distribución de alelos similar a la descrita en caucásicos, lo cual revela cierta mezcla producto del flujo génico entre poblaciones. En Chi y Wi se encontró una reducción en la diversidad alélica, ambas poblaciones presentan alelos típicamente amerindios y comparten el resto de sus alelos con poblaciones del noreste asiático. En las poblaciones analizadas parecería que el locus HLA-C es neutro a nivel de selección.

357. Infección in vitro con *Trypanosoma cruzi* en macrófagos peritoneales (MP) de ratas de distinta edad. Fernanda Pascutti¹, Eduardo Roggero¹, Esteban Serra², Oscar Bottasso¹, Silvia Revelli¹

¹ *Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas,*

² *Instituto de Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacia, Universidad Nacional de Rosario.*

Estudios previos indican que la infección con *T.cruzi* en ratas adultas -A- (70-120 días) da lugar a una enfermedad aguda de escasa jerarquía, no así cuando se las infecta al destete -D- (Medicina 47:360, 1987). Para determinar si ello se debía a un diferente comportamiento del macrófago frente a los tripomastigotes, se obtuvieron MP de ratas A y D que tras 18 hs. de incubación (medio RPMI suplementado con 10% de SFB) fueron expuestos al *T.cruzi* (relación parásito:célula 0.5:1, 1:1 y 5:1) para realizar, a las 4 hs. post-exposición un análisis del desarrollo de apoptosis, y a las 24 y 48 hs. el recuento de parásitos presentes en el sobrenadante de cultivo, y la determinación de las concentraciones de nitrito, nitrato y factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α). No se observaron mayores diferencias en las variables en estudio según la relación parásito:célula y el momento del estudio. La determinación de apoptosis por la técnica de TUNEL no mostró diferencias significativas entre los grupos observados. El número de *T.cruzi*/ml (concentración relativa) en el sobrenadante de cultivo a las 24 hs. para la relación 5:1 fue D: 0.89 ± 0.24 , $n=6$ (media \pm ds), A: 0.87 ± 0.18 , $n=6$. No se detectaron cantidades mensurables de nitrito-nitrato en esas condiciones. Los niveles de FNT- α (pg/ml) al mismo momento fueron D: 1.4 ± 0.9 , A: 3.32 ± 1.5 . La menor severidad de la infección aguda de las ratas A no se acompaña de una mayor capacidad de los macrófagos «per se» para la eliminación del parásito y síntesis de mediadores comprometidos en tal evento.

FARMACOLOGIA

358. Evaluación de actividad apoptótica: un modelo en células cultivadas in-vitro. Maximiliano Cella, Mónica Butti, Félix Coulombié, Susana Mersich.

Laboratorio de Virología. Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

El objetivo del trabajo fue ensayar la actividad apoptótica de distintos extractos acuosos obtenidos a partir de hojas frescas de *Trichilia glabra*, con actividad inmunomoduladora conocida y posible actividad antiviral o virucida contra el virus de la estomatitis vesicular. Se ensayó la citotoxicidad de estos extractos sobre células MDCK (Madin Darby Canine Kidney) cultivadas en monocapa, eligiéndose luego aquellas concentraciones cuya citotoxicidad fuera menor al 20%, de forma de poder ser usadas en los ensayos de apoptosis. La presencia de apoptosis se de-

terminó mediante observación de cambios morfológicos nucleares por tinción con el reactivo de Hoescht, realizándose controles positivos por incubación de las células con los agentes químicos Etopósido (inhibidor de la Topoisomerasa II) y EDTA (agente quelante). El porcentaje máximo de células en apoptosis observado en presencia de Etopósido 25µM fue de 60%. Si bien uno de los extractos presentó actividad virucida, ninguno de ellos mostró actividad antiviral en las condiciones ensayadas. Aún cuando ninguna fracción presentó actividad apoptótica, dos de las mismas exhibieron una aparente actividad inhibidora de la apoptosis del 20%, respecto del control. Por lo tanto el modelo propuesto podría usarse para un screening sencillo de actividad apoptótica en células de cultivo.

359. Efecto antioxidante del losartan (L) en la lesión túbulointersticial renal (LTI) Elena de Cavanagh¹, Leon Ferder³, César Fraga¹, Margarita Angerosa², Felipe Insererra³, Jorge Toblli²

¹ Físicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Buenos Aires; ² Laboratorio de Medicina Experimental, Hospital Alemán; ³ Laboratorio de Nefrología Experimental, Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Buenos Aires.

Se evaluó el efecto de L 40 mg/Kg/día sobre la LTI de la Hox por etilenglicol. 24 ratas Sprague-Dawley macho recibieron (28 días): 1. Agua (Control), 2. etilenglicol 1% en agua (ETG); 3. etilenglicol 1% y L (ETG+L); 4. L (L). Se determinaron: clearance de creatinina, proteinuria, y excreción urinaria de oxalato. La LTI se evaluó por microscopía óptica con un score semicuantitativo. En homogeneizados de riñón se evaluaron por espectrofotometría parámetros de estrés oxidativo (EO): contenido de glutatión total (GSH-T), glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), y sulfhidrilos asociados a proteínas (-SH), actividades de Se-glutatión peroxidasa (Se-GPx) y glutatión reductasa (GSSG-Rd); la oxidación lipídica se estimó por fluorometría (TBARS). Resultados: al final del tratamiento la excreción de oxalato era significativamente mayor en ETG y ETG+L vs. Control y L. El grupo ETG+L mostró menor proteinuria, mayor Clearance Cr y menor LTI comparado con ETG (p<0.05). Parámetros de EO, A. GSH-T, Control: 263.4 ± 24.9, ETG: 205.5 ± 28.9, ETG+L: 360.3 ± 34.4*, L: 297.8 ± 22.1 nmol/g tejido fresco, B. GSH/GSSG, Control: 14.0 ± 1.6, 13.5 ± 0.9, ETG+L: 12.2 ± 1.4, L: 11.8 ± 1.3, C. Se-GPx, Control: 27.6 ± 2.1, ETG: 40.6 ± 4.0*, ETG+L: 28.0 ± 3.3*, L: 22.7 ± 2.3* mU/mg proteína, D. GSSG-Rd: Control: 60.5 ± 2.6, ETG: 61.0 ± 6.2, ETG+L: 48.5 ± 2.5* #, L: 41.6 ± 1.3* # mU/mg proteína, E. -SH, Control: 82.8 ± 2.8, ETG: 85.3 ± 10.3, ETG+L: 117.3 ± 12.4* &, L: 151.8 ± 11.6* # nmol/mg proteína, D. TBARS, Control: 0.70 ± 0.06, ETG: 0.66 ± 0.09, ETG+L: 0.35 ± 0.01* #, L: 0.35 ± 0.10* # nmol equiv MDA/mg proteína (*p<0.05 vs. Control; # p<0.05 vs. ETG; & p<0.05 vs. L) Conclusión: L protege contra la LTI por ETG, modifica parámetros de EO y atenúa la oxidación de lípidos y proteínas.

360. Variaciones dosis dependientes en las actividades de ornitina decarboxilasa, proteína quinasa de tirosina y proteína quinasa C en hígado de ratas intoxicadas con hexachlorobenceno. Andrea Randi, Susana Hernández, Laura Alvarez, Marcela Sanchez, Marta Schwarcz, Diana L. Kleiman

Departamento de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

El hexachlorobenceno (H) es un contaminante ambiental, inductor de tumores en roedores y humanos. Nuestro objetivo fué investigar la dependencia de la dosis del efecto del H sobre la actividad de ornitina decarboxilasa (ODC), el contenido de poliaminas y las actividades de PTK y PKC. Ratas Wistar hembras se intoxicaron con H (1,10 ó 100mg/100g p.c.), por 24hs. Se observó en hígado un aumento a 10 y 100mg, en la actividad de ODC, medida por liberación de CO₂ a partir de [L-1-¹⁴C]ornitina, (C: 5,87 ± 0,83; H₁₀: 19,87 ± 1,80; p<0,005); la actividad de PTK medida

por la incorporación de [³²P] al poliglu-tir, disminuyó a las mismas dosis (C: 29,58 ± 2,58 ; H₁₀: 11,70 ± 2,16; p<0,05), y la actividad de PKC, medida por la incorporación de [³²P] a ser²⁵-PKC (frag. 19-31) aumentó a todas las dosis ensayadas (C: 10,78 ± 0,17 y H₁₀: 35,85 ± 1,09 pmol/min.mg; p<0,05). Los niveles de espermina evaluados por la cuantificación fluorométrica de los dansilderivados de las poliaminas separadas por TLC, aumentaron solo a la mayor dosis (C: 522,33 ± 70,12 y H₁₀₀: 849,10 ± 56,72 nmol/g; p<0,05). El efecto observado sobre la actividad de PTK persistió en presencia de DFMO un inhibidor de la ODC, indicando que las poliaminas no estarían involucradas en la disminución de la actividad de PTK. Conclusión: el H modifica en función de la dosis y a tiempos muy cortos, parámetros funcionales relacionados con transformación celular siendo la actividad de PKC la más sensible a la dosis.

361. Rol de Amlodipina sobre lesiones tubulointersticiales en nefropatía hiperoxalúrica. Jorge Toblli, Margarita Angerosa, León Ferder, Felipe Insererra

Laboratorio de Medicina Experimental. Hospital Alemán e Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Buenos Aires.

Nuestros estudios indican que IECA protege del daño túbulointersticial (DTI) producido por hiperoxaluria (Hypertension 1999; 33: 225-231). En el presente experimento se evaluaron los efectos de un calcioantagonista, amlodipina (A) sobre el modelo de DTI por hiperoxaluria inducida por etilenglicol (ETG). Machos SD adultos. G1) control (n=6), G2) ETG (n=6), G3) ETG +A (n=6), G4) A(n=6). G2 y G3 con ETG1% en el agua y A 2mg/kg/día por sonda en G3 y G4 durante 4 semanas. Días 1 y 28 se registró tensión arterial sistólica (TAS) y se recolectó orina de 24hs. para oxalato (Uox) y clearance de creatinina (Clcr.). El día 29 todos los animales fueron sacrificados para su estudio patológico (H&E; PAS; Masson). El DTI se evaluó por score semicuantitativo (0-4), 0=aus; 1= leve; 2=mod.; 3=sev; 4= muy sev. Resultados (x ± sem) al finalizar el experimento: 1)TAS (mmHg) G1= 123,2 ± 0,5; G2=124 ± 0,7; G3=123,5 ± 0,5; G4=123 ± 0,4 (NS); 2) Uox. (mg/g rata/día) G1= 1,5 ± 0,03; G2=12 ± 0,8*; G3=13,2 ± 2*; G4=1,4 ± 0,02; b) Cl.cr.(ml/min) G1= 1,23 ± 0,07; G2= 1,13 ± 0,08#; G3=1,22 ± 0,08; G4=1,23 ± 0,08; c) Score DTI, G1= 0,2 ± 0,16; G2=3 ± 0,34#; G3= 1,7 ± 0,2*; G4=0,2 ± 0,1. p< 0,05 *vs. G1&G4; # vs. G1,G3,G4. Conclusión: A produce una moderada disminución del DTI por hiperoxaluria sin modificaciones de la TAS y conservando la función renal.

362. Efectos de un IECA y un calcioantagonista benzotiazepínico sobre las lesiones tubulointersticiales en ratas nefróticas. Jorge Toblli, Graciela DeRosa, Gabriel Cao, Margarita Angerosa

Laboratorio de Medicina Experimental. Hospital Alemán & Departamento de Patología, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires.

Con el objetivo de evaluar el rol de enalapril (E) y diltiazem (DTZ) sobre las lesiones tubulointersticiales (LTI) en ratas nefróticas (RN) por administración de adriamicina (AD) se realizó este estudio. Machos SD adultos. G1 (n=18) RN; G2 (n=18) RN+DTZ y G3 (n=18) RN+E. Todos los Gs recibieron AD 7,5mg/Kg, dosis única IV. Duración del estudio 8 semanas. G1 con agua común, G2 con DTZ 25mg/L y G3 E 20mg/L ambos en el agua "ad libitum". Se determinó Presión arterial (PA) por "tail cuff", Proteinuria (Up), Creatininemia (Scr.) y se analizó el grado de glomerulosclerosis (GS) y las LTI según score semicuantitativo (0-4) 0= aus; 1= <25%; 2= 25-50%; 3= 51-75%; 4= >76%. Se efectuaron los test de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn. Resultados 8va. Semana (X ± DS): 1)PA(mmHg)= G1 141,3 ± 5,7*; G2 119,4 ± 2,2; G3 119,2 ± 3,8. 2)Up (mg/día)= G1 412,5 ± 62,7*; G2 269 ± 107; G3 255,8 ± 113. 3)Scr.(mg/dL)= G1 1,1 ± 0,2; G2 1,1 ± 0,5; G3 0,6 ± 0,1#. 4)Score GS= G1 3 ± 0,8; G2 2,9 ± 0,8; G3 2,3 ± 0,6#. 5)Score LTI= G1 2,5 ± 0,9; G2 2,3 ± 0,8; G3 1,3 ± 0,5#. *vs.G2&G3 p<0,001. # vs. G1&G2 p<0,001. En conclusión : a) E y DTZ disminuyen Up en forma similar; b) Los niveles mas bajos de Scr. se encontraron en

el G3. c) Ni DTZ ni E protegieron significativamente el desarrollo de GS, pero el G de E evidenció menor daño. d) Solo el G3 mostró una significativa protección a nivel de LTI.

363. Efecto antioxidante del enalapril (E) en la lesión túbulointersticial renal (LTI). Elena M. V. de Cavanagh¹, Leon Ferder³, Cesar G. Fraga¹, Margarita Angerosa², Felipe Inserra³, Jorge E. Toblli²

¹ Físicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Buenos Aires; ² Laboratorio de Medicina Experimental, Hospital Alemán; ³ Laboratorio de Nefrología Experimental, Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Buenos Aires.

Se evaluó el efecto de E (20 mg/L agua bebida) sobre la LTI de la hiperoxaluria (Hox) por etilenglicol. 24 ratas Sprague-Dawley macho recibieron (28 días): 1. Agua (Control), 2. etilenglicol 1% en agua (ETG); 3. etilenglicol 1% y E (ETG+Enal); 4. E (E). Se determinaron: clearance de creatinina, proteinuria, y excreción urinaria de oxalato. La LTI se evaluó por microscopía óptica con un score semicuantitativo. En homogeneizados de riñón se evaluaron por espectrofotometría parámetros de estrés oxidativo (EO): contenido de glutatión total (GSH-T), glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), sulfhidrilos asociados a proteínas (-SH), actividades de Se-glutatión peroxidasa (Se-GPx) y glutatión reductasa (GSSG-Rd); la oxidación lipídica se estimó por fluorimetría (TBARS). Resultados: al final del tratamiento la excreción de oxalato estaba significativamente aumentada en los grupos ETG y ETG+E vs. Control y E. Grupo ETG+E mostró menor proteinuria, y menor LTI vs. ETG ($p < 0.05$). Parámetros de EO, A. GSH-T, Control: 263.4 ± 24.9 , ETG: 205.5 ± 28.9 , ETG+E: $305.6 \pm 40.3^*$, E: 390.4 ± 232.6 nmol/g tejido fresco, B. GSH/GSSG, Control: 14.0 ± 1.6 , ETG: 13.5 ± 0.9 , ETG+E: $40.3 \pm 17.1^{**}$, E: 24.3 ± 9.3 , C. Se-GPx, Control: 27.6 ± 2.1 , ETG: $40.6 \pm 4.0^*$, ETG+E: 32.2 ± 1.9 , E: 38.2 ± 7.7 mU/mg proteína, D. GSSG-Rd: Control: 60.5 ± 2.6 , ETG: 61.0 ± 6.2 , ETG+E: $49.9 \pm 2.6^{**}$, E: $50.3 \pm 1.8^{**}$ mU/mg proteína, E. -SH, Control: 82.8 ± 2.8 , ETG: 85.3 ± 10.3 , ETG+E: 96.6 ± 8.8 , E: 108.4 ± 13.0 nmol/mg proteína, D. TBARS, Control: 0.70 ± 0.06 , ETG: 0.66 ± 0.09 , ETG+E: $0.40 \pm 0.04^* \#$, E: 0.55 ± 0.04 nmol equiv MDA/mg proteína (* $p < 0.05$ vs Control; # $p < 0.05$ vs ETG). Conclusión: E protege contra la LTI por ETG, modifica parámetros de EO y atenúa la oxidación de lípidos y proteínas.

364. Diferencias clínicas en la respuesta terapéutica de los antagonistas D₂-5HTA₂, Risperidona y Clozapina, luego de la observación prolongada de pacientes esquizofrénicos hospitalizados. Norberto Zelaschi, Juana Rodríguez, Sergio Gaitán, Sergio Panizzo, Azucena Sobrero, Angelica López, Fernando Archuby

Hospital Neuropsiquiátrico "Dr. A. Korn". Facultad de Ciencias Médicas Universidad Nacional de La Plata.

Objetivos: Mostrar evidencia complementaria de cambios clínicos diferenciales por los antipsicóticos atípicos (AA) cuando el seguimiento se extiende a largo plazo (2 años de seguimiento). **Método:** Se estudió un grupo de 23 pacientes con diagnóstico de esquizofrenia (Criterio DSM IV), hospitalizados en un sector de seguimiento a largo término. **Escala Utilizadas:** Se utilizó la escala CGI (Clínica Global Impression) para evaluar la evolución y la recaída. Los criterios de inclusión y recaída ya han sido descriptos (SAIC 1998). **Resultados:** Los datos presentados se expresan en promedio ± 1 DS. La prueba X^2 fue utilizada para comparar los éxitos vs. fracasos con ambas drogas. De los 23 pacientes seleccionados, 15 resultaron elegibles para Ris: edad = 56.00 ± 11.98 y 9 para Cz: edad = 41.00 ± 6.92 ; el rango de dosis para Ris fue de 2-5 mg/día y para la Cz de 150-500 mg/día. **Éxitos y Fracasos:** Con Ris 4 respondieron y 11 recayeron, en tanto que con Cz 8 respondieron y 1 salió del estudio al desarrollar neutropenia (Test de $X^2=11.27$ para $\infty=0.05$, $p=0.0008$). **Conclusiones:** Lo destacable de este estudio es que el seguimiento prolongado puede detectar diferencias en la respuesta entre los

AA. Luego de 24 meses de seguimiento la Cz aparece terapéuticamente superior a Ris.

365. Participación de receptores para angiotensina II (AT) del subtipo AT₁ en la vasoconstricción renal inducida por el agonista GABA_B, baclofen. Liliana Monasterio, Verónica García, Mónica Elías

Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. CONICET

En trabajos anteriores hemos descripto que GABA y baclofen provocan un aumento de la presión de perfusión (PP) renal. Los objetivos del presente estudio fueron evaluar: 1) el posible rol de receptores AT₁ en la vasoconstricción observada con baclofen, y 2) la respuesta vascular a AT en presencia de baclofen. Se utilizó el modelo de riñón aislado y perfundido de rata. Luego de 30 min de estabilización (control) se estudiaron los efectos sobre PP a flujo constante de: i) baclofen (BAC, 0.05-500 μ M, $n=7$), ii) BAC en presencia de losartán 1 μ M (LOS+BAC, $n=5$), iii) AT (0.01-100 nM, $n=8$) y iv) AT en presencia de baclofen 100 μ M (BAC+AT, $n=7$). Se calcularon los % de cambio relativos al control. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM. La curva de PP versus concentración de BAC se desplazó a la derecha por la presencia de losartán (PP % cambio: BAC_{200 μ M} = 14.1 ± 1.5 , LOS+BAC_{200 μ M} = 6.6 ± 2.7 ; $p < 0.05$). AT provocó un aumento concentración-dependiente de PP que se vio potenciado en el grupo pretratado con BAC (PP % cambio: AT_{10 nM} = 153.8 ± 5.9 , BAC+AT_{10 nM} = 234.6 ± 10.2 ; $p < 0.0001$). Los resultados señalan un posible rol para los receptores AT₁ en el incremento de la resistencia vascular inducida por BAC, y demuestran la capacidad de este último de aumentar la respuesta presora a AT. Estos hallazgos sugieren la posibilidad de una interacción entre receptores GABA_B y el sistema renina-angiotensina.

366. Efecto de la calcinosis arterial sobre la depuración sistémica de aniones orgánicos en ratas. Estudio con dulfanilamida. Nora Quaglia, Adriana Torres.

Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. CONICET.

En trabajos anteriores se administró vitamina D3 a ratas con el fin de reproducir un modelo de calcinosis arterial. Se observaron variaciones de: presión arterial, calcemia, calciuria, depuración hepática y renal de aniones orgánicos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la farmacocinética de sulfanilamida (SA, droga usada como modelo de anión orgánico excretado principalmente por vía renal) en ratas con calcinosis arterial. Se usaron ratas Wistar machos controles (C; $n=6$) y tratadas con una dosis de Vitamina D3 (300000 IU/kg p.c.; i.m. 5 días antes; D; $n=7$). Se les administró una dosis única de SA (4 mg/kg p.c.; i.v.). Los datos se ajustaron a un modelo bicompartmental. Los resultados obtenidos fueron: Depuración sistémica (ml/min/100g): C = 2.58 ± 0.17 , D = 3.12 ± 0.10 , $P < 0.05$; Constantes de velocidad híbridas (min^{-1}): α : C = 1.56 ± 0.24 , D = 2.23 ± 0.37 y β : C = 0.058 ± 0.005 , D = 0.073 ± 0.003 , $P < 0.05$; Constante de velocidad de eliminación K1-0 (min^{-1}): C = 0.16 ± 0.01 ; D = 0.15 ± 0.01 ; Volumen de Distribución Central (Vdc, ml/100g): C = 16 ± 1 , D = 22 ± 1 , $P < 0.05$. De los datos observados jerarquizamos la mayor depuración de SA en los animales tratados debido probablemente a un aumento en Vdc. Las alteraciones en algunos lechos vasculares previamente descriptas en este modelo experimental podrían justificar los resultados obtenidos.

367. Interacción entre óxido nítrico (NO) y prostaglandina E (PGE) en un modelo de endotoxemia. Alejandro Lomniczi^a, Claudia Mohn^b, Alicia Faletti^b, Victoria Mendizábal^c, Edda Adler^c, Martha Gimeno^b, Valeria Rettori^b

^a Cátedra de Fisiología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires. ^b Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos CONICET. ^c Instituto de Investigaciones Farmacológicas, Universidad de Buenos Aires.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la relación entre los niveles de NO y PGE en tejidos centrales (hipotálamo (HMB) y adenohipófisis (AH)) y periféricos (Glándula submaxilar (GSM) y lecho mesentérico (LM)) durante la endotoxemia. Se inyectó LPS (5 mg/rata i.p.) a ratas macho adultas. Se midió la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) por el método de la ¹⁴C-citrulina y los niveles de PGE por RIA. LPS aumentó la NOS en todos los casos. Por ej. (HMB: Control (C)=111,3 ± 7,5 pmoles/10min/HMB, LPS= 139,4 ± 4,7 p<0,05; GSM: C=7,4 ± 0,4 pmoles/15min/ GSM, LPS=8,5 ± 0,3 p<0,05)(n=8-10), resultados similares se obtuvieron en AH y LM. LPS+aminoguanidina (AG)(20mg/kg) o LPS+ meloxicam (M) (0,25mg/kg) produjo distintas respuestas (HMB: LPS+AG=141,8 ± 5,8; LPS+M=135,8 ± 11,8; GSM: LPS+AG= 7,2 ± 0,5; LPS+M= 6,2 ± 0,7; ambos p<0,01 vs. LPS) (n=6-8). Asimismo LPS aumentó la PGE en los siguientes tejidos: (HMB: C=42,8 ± 2,4 pg/HMB; LPS=127,5 ± 9 p<0,001; SMG: C=345,5 ± 17,7pg/ GSM; LPS=806,5 ± 51,8 p<0,001). En HMB solo el M produjo reversión de este aumento (LPS+M= 75,71 ± 17,9 p<0,01), en cambio en la GSM ambos inhibidores revertieron el efecto de LPS (LPS+AG= 364,74 ± 15,8 p<0,001; LPS+M= 599,9 ± 42,78 p<0,05) (n=7-10 en todos los casos). Estos resultados demuestran que al menos en la GSM existe una interrelación entre ambos mediadores inflamatorios.

368. Participación de la óxido nítrico sintasa en la secreción de amilasa estimulada por péptido intestinal vasoactivo en glándulas salivales de ratón. Florencia Rosignoli, Claudia Pérez Leirós

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

La secreción de las glándulas salivales está regulada por el sistema nervioso autónomo a través de la activación de receptores colinérgicos, adrenérgicos y de neuropéptidos, acoplados a diferentes vías de transducción de señales. El objetivo de este trabajo es investigar la participación de la óxido nítrico sintasa (NOS) en el proceso de secreción de amilasa por glándulas submaxilares de ratón estimuladas con péptido intestinal vasoactivo (VIP). Se midió la actividad de NOS en glándulas utilizando L-(U-¹⁴C)arginina como sustrato y la secreción de amilasa como actividad de la enzima liberada sobre la actividad total en las glándulas por un método colorimétrico. La incubación de las glándulas submaxilares con VIP (10⁻⁸ M) estimuló la secreción de amilasa (%liberada/total, x ± ES basal: 15 ± 4 VIP: 37 ± 9 n=8), en presencia de L-NAME (inhibidor de NOS) aumentó la secreción de amilasa inducida por VIP y el efecto fue revertido con L-arginina mientras que la secreción basal de amilasa no se modificó con L-NAME. Por otro lado, VIP estimuló la actividad de NOS en las glándulas (pmol/mg, x ± ES basal: 1,4 ± 0,2 VIP: 2,1±0,2 n=5), y este aumento fue inhibido por PMA, un activador de PKC, y por carbacol a concentraciones que estimulan PKC y secreción de amilasa. Los resultados indican que la activación de NOS modula negativamente la secreción de amilasa inducida por VIP en glándulas submaxilares de ratón.

369. Efectos proinflamatorios del IFN γ en glándula submaxilar murina. Alejandro Español, Eugenia Sacerdote de Lustig, María Sales

Departamento de Inmunobiología, Instituto de Oncología Angel Roffo, Universidad de Buenos Aires.

La glándula submaxilar (GSM) murina es un sitio de síntesis de citoquinas, mediadoras fisiológicas en: activación y proliferación celular o reacciones inflamatorias y también en patologías: sialoadenitis o infecciones bacterianas. Hemos descrito que el IFN γ estimula la secreción de amilasa salival (AS) (mg maltosa/min.mg tej hum) (basal: 1.18 ± 0.28, n=5; IFN γ : 2.30 ± 0.12, n=5) en GSM. Dicho efecto es bloqueado parcialmente por L-NMMA (10⁻⁴ M), por lo que determinamos la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) (pmoles/g tej.hum.). En animales control la actividad basal: 634 ± 58 (n=6) es estimulada por IFN γ (10 U/ml): 818 ± 61 (n=5), mientras que en animales sometidos a un proce-

so de inflamación localizada (PIL) el IFN γ (10 U/ml) no revirtió la inhibición en la actividad basal de AS (basal: 0.68 ± 0.16 n=5; IFN γ : 0.88 ± 0.15 n=4. La actividad NOS en animales PIL fue: basal: 920 ± 61 (n=5) IFN γ (10 U/ml): 1052 ± 101 (n=5). Determinamos por RIA los niveles de prostaglandina E₂ (PGE₂) como mediador inflamatorio (pg/g tej hum) en animales C y PIL respectivamente: basal: 3.7 ± 0.4 (n=3) IFN γ (10 U/ml): 4.9 ± 0.5 (n=3); basal: 31.6±4.5 (n=4), IFN γ (10U/ml): 34.9 ± 4.1 (n=4). Concluimos que el IFN γ estimula la secreción de AS en forma NO dependiente en animales C mientras que en PIL la secreción de AS se encuentra inhibida probablemente debido a una vasoconstricción PGE₂ dependiente.

370. Denitrificación microsomal hepática del nitrofurano nifurtimox. Patricia Carrizo, Marta Dubin, Andrés Stoppani.

Centro de Investigaciones Bioenergéticas, CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

El nifurtimox (NFX) es un tripanocida utilizado en el tratamiento del Chagas agudo. Tiene efectos "no deseados" (citotóxicos) en el paciente tratado cuyo mecanismo es necesario conocer. Carrizo y col. (SAIC 1997) informaron que la incubación del NFX con microsomas de hígado de rata libera nitrito (NO₂⁻) y nitrato (NO₃⁻), los cuales se determinan por la reacción de Griess. Para dilucidar las etapas involucradas en este proceso se estudió la producción de NO₂⁻ en presencia de NFX 0,2 mM, NADPH 1 mM y microsomas hepáticos (1 nmol citocromo P₄₅₀ (P₄₅₀)/ml) aislados de ratas pre-tratadas con metimazol (M; inhibidor de la síntesis de NADPH-cit P₄₅₀ reductasa; P₄₅₀ red), Co-protoporfirina IX (CoP; inhibidor de P₄₅₀ red y del P₄₅₀), fenobarbital (F; inductor del P₄₅₀) o burbujeados con CO (inhibidor del P₄₅₀). Los nmoles de NO₂⁻/nmol P₄₅₀ obtenidos fueron (x ± ESM): 14,2 ± 0,8 (M); 13,6 ± 2 (CoP); 92,6 ± 0,1 (F); 18,2 ± 1,5 (CO); 31 ± 1,3 (Control); P<0,01; n=3. Se estudió la actividad nitro-reductasa de la enzima DT-diaforasa parcialmente purificada de hígado de rata (8,65 µg/ml, 50-70% sulfato de amonio y diálisis), en presencia de NFX 0,2 mM, NADPH 0,5 mM y citocromo c 77 µM. En estas condiciones no se pudo detectar ni la reducción del cit c ni el consumo de NADPH. Los resultados obtenidos indican la participación de las enzimas P₄₅₀ red y del P₄₅₀ en la denitrificación microsomal hepática del NFX, sin descartar otras vías alternativas.

371. Farmacocinetica (F) del FK506 (FK) en Trasplantados (Tx) Renales(R) y Cardíacos (C). Mildren Del Sueldo, José Sgrosso, María Sal, Silvia Tirado, Paola Goette, Eduardo Fernández, Rodolfo Gandur, Mario Taborda, María Vázquez.

Departamento de Trasplantes. Instituto Cardiovascular de Rosario. Centro de Trasplantes Tucuman.

Se investigaron las posibles diferencias en la F del FK entre Tx R y C. **Material y Métodos:** 8 P(4 C y 4 R) Tx clínicamente estables, se evaluaron 3 meses post-trasplante. El FK se administró vía oral cada 12 horas en dosis iguales. Se utilizó el método IMX Tacrolimus II MEIA(Abbott). Se lo dosó en sangre entera, las muestras se obtuvieron pre-dosis y luego en forma horaria por 12 horas. La concentración máxima expresada en ng/ml de FK y la hora correspondiente se denominaron Cmax y Tmax respectivamente. La concentración medida antes de la ingestión matutina se denominó CminA y CminB la obtenida pre-dosis de la noche. **Resultados:**

P	1R	2R	3R	4R	1C	2C	3C	4C
Cmax	32.9	29	19.5	15.9	29	39	9.7	22.9
Tmax	1	3	4	6	3	2	7	2
CminA	5.8	10.2	9.9	5.1	6.1	11	6.7	7.9
CminB	4.3	7.4	9.9	4.4	9.5	9.7	6.8	9

Conclusiones: en esta muestra no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre CminA y CminB (T-test, p=.75). Cmax se alcanzó en horas diferentes debido a la variabilidad interindividual. CminA no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los trasplantados renales y cardíacos (T-test, p=.28).

372. Monitoreo del FK506 (FK) y su correlación con el Area Debajo de la Curva (AUC). Mildren Del Sueldo, María Sal, José Sgrosso, Silvia Tirado, Rodolfo Gandur, Mario Taborda, Eduardo Fernandez, Paola Goette, María Vázquez.

Departamento de Trasplantes. Instituto Cardiovascular de Rosario, Centro de Trasplante Tucuman.

FK506 es una droga usada como inmunosupresor en trasplante de órganos sólidos. Hasta la fecha existe el concepto que la concentración mínima (C_{min} ó pre-dosis) del FK en sangre entera tiene una excelente correlación con el AUC, indicando que la C_{min} es un buen indicador de la exposición sistémica de la droga. El propósito de este trabajo es evaluar si otra concentración predice mejor el AUC del FK. **Material y Métodos:** se estudiaron ocho pacientes (P) trasplantados (4 cardíacos y 4 renales). Los P se estudiaron tres meses después del trasplante. El FK se suministró vía oral en dosis iguales y cada 12 horas. No se modificó la dosis las dos semanas previas. La primera muestra fue previa a la dosis de la mañana y luego horarias por 12 horas. El FK se midió en sangre entera usando IMX Tacrolimus II MEIA (Abbott). El AUC fue calculado de 0 a 12 horas usando la regla lineal trapezoidal. La predicción del AUC por una sola concentración fue basada en el modelo de regresión lineal, independientemente del tipo de trasplante. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos con una p de 0.05. **Resultados:** C_{min} explicó solo el 48% de las variaciones del AUC (r²= 0.476, p<0.039). Las concentraciones en sangre a la hora 9 fueron las mejores predictoras del AUC y explicaron el 81% de las variaciones de la concentración del FK (r² = 0.81, p<0.0009). **Conclusión:** estos resultados muestran que la concentración a la hora 9 es el mejor predictor del AUC.

373. Excreción de Lisozima en ratas con nefropatía urica tratadas con Citrato de Potasio. Jorge Toblli, Margarita Angerosa, Patricia Pagano, Cristina Nyberg

Laboratorio de Medicina Experimental. Hospital Alemán, Buenos Aires.

En nuestros estudios previos de nefropatía úrica (NU) demostramos daño funcional y anatómico en túbulos proximales (JASN 8:608;1997) y comunicamos la protección del citrato de potasio (KCi) sobre las lesiones tubulointersticiales (JASN 8: 568; 1997). El objetivo de este estudio fue evaluar si el KCi puede reducir la excreción de lisozima (LZ) en orina, conocido marcador de daño tubular proximal, en la NU. Machos SD adultos. G1 (n=12) NU+KCi; G2 (n=12) KCi y G3 (n=12) NU. Duración del estudio 4 semanas. G1 y G3 recibieron 2% ac. oxónico (inhibidor de uricase) con el alimento, G2 alimento standard. G1 y G2 recibieron 2% KCi en el agua "ad libitum". Se determinó LZ por difusión radial previa concentración de orina por ultrafree-MC NMWL 5000. Se analizó además: uricemia, uricosuria (AUO), Citraturia (CiU), pH urinario (pHu), LZ urinaria, clearance de creatinina (Clcr.). Resultados 4ta. Semana (X ± sem): 1) AUO (µg/g rata/día)= G1 21,6 ± 2,3#; G2 6,8 ± 0,7; G3 22,7 ± 1,3#. 2) CiU (mg/g rata/día)= G1 96,1 ± 3,4*; G2 93,3 ± 6*; G3 22,9 ± 1,3. 3) pHu= G1 7,2 ± 0,01*; G2 7,3 ± 0,01*; G3 6,1 ± 0,02. 4) LZ (ng/g rata/día)= G1 80,1 ± 2,3*; G2 78,5 ± 4,1*; G3 134,5 ± 12,2. 5) Clcr.(ml/min)= G1 1,36 ± 0,02*; G2 1,48 ± 0,02*; G3 0,74 ± 0,01. #vs.G2 p<0,001. * vs. G3 p<0,001. En conclusión: estos resultados sugieren que el tratamiento con KCi proporciona un beneficio significativo en relación al daño funcional del túbulo proximal en la NU.

374. Perfil bioquímico del pulmón de ratas sometidas a ventilación forzada con glucocorticoides. Carlos Elías, Sofía Gimenez*, Marta Ojeda*, Edgardo Alvarez.

*Cátedra de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. * Departamento de Bioquímica. Universidad Nacional de San Luis.*

El objetivo del presente trabajo fue evaluar si la ventilación forzada prolongada con Budesonida (Bud) era o no capaz de afectar parámetros bioquímicos generales en el pulmón. Durante 15 días

se expuso ratas por 5 min, 2 veces al día a una caja de ventilación forzada con Bud (1.16 µmol/ml disolución nebulizante n = 6) o con salina (SAL, control, n=6). Veinte y cuatro horas después de finalizado el tratamiento, los dos grupos de animales se sacrificaron y los pulmones extirpados se sometieron a análisis bioquímico de proteínas, triglicéridos, colesterol total, ésteres de colesterol y fosfolípidos. Los resultados mostraron que Bud provocó una disminución significativa de los triglicéridos (8.28 ± 0.8 µg/mg lípidos vs 4±0.4 µg/mg lípidos, SAL vs Bud, p<0.0001) y fosfolípidos del parénquima pulmonar (7.63 ± 0.3 µmol/g tejido vs 5.64 ± 0.4 µmol/g tejido, SAL vs Bud, p<0.001), sin modificaciones en los lípidos y proteínas totales. La evaluación de los parámetros bioquímicos en el surfactante pulmonar externo reveló que Bud aumentó significativamente el colesterol total (292.9 ± 50 µg/mg lípidos vs 406.1 ± 47 µg/mg lípidos, SAL vs Bud, p<0.0001) y el fósforo (0.53 ± 0.1 µmol/g tejido vs 0.9±0.1 µmol/g tejido, SAL vs Bud, p<0.001). Los datos actuales sugieren que el tratamiento prolongado con Bud afecta el parénquima y al surfactante pulmonar.

375. Estudio dosis - respuesta: Ligaria cuneifolia - parámetros hemorreológicos y secreción biliar. Guillermo Mengarelli, Mariana Ferraro, María de Luján Alvarez, Marcelo Wagner, Alberto Gurni, Cristina Carnovale, Alejandra Luquita

Cátedra de Fisiología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas - Universidad Nacional de Rosario - IFISE (CONICET). Cátedra de Biofísica, Facultad de Ciencias Médicas - Universidad Nacional de Rosario.

Lc es una planta hemiparásita argentina que posee acción farmacológica. **Objetivo:** analizar el efecto del tratamiento con dosis crecientes de Lc sobre la fluidez de la sangre y sobre la excreción biliar (única vía de excreción del colesterol, Co). **Métodos:** Ratas Wistar machos adultos Controles (C) (n: 6) seinyectaron con Solución Fisiológica, i.p. y las Tratadas (T) (n: 5, cada uno) se inyectaron 24 horas durante 3 días con **1,5; 2,5; 3,5 y 5,5 mg/100g** peso corporal, i.p. **Resultados:** (x media ± ES) *Viscosidad sanguínea* (después de ajustar a un hematocrito del 45%): **C:** 4,65 ± 0,43; **T1,5:** 6,31 ± 0,25; **T2,5:** 8,47 ± 0,75**; **T3,5:** 7,36 ± 0,20*; **T5,5:** 7,27 ± 0,35*. *Índice de rigidez:* **C:** 8,37 ± 0,62; **T1,5:** 7,20 ± 0,57; **T2,5:** 17,25 ± 2,39**; **T3,5:** 13,67 ± 1,98*; **T5,5:** 13,00 ± 0,99*. *Descenso de Co plasmático:* **T1,5:** 19,66 ± 3,90*; **T2,5:** 17,25 ± 1,65*; **T3,5:** 15,00 ± 3,51*; **Te,e:** 18,60 ± 3,00**. *Excreción biliar de sales biliares:* **C:** 42,7 ± 3,8; **T1,5:** 49,4 ± 4,0; **T2,5:** 83,1 ± 5,0**; **T3,5:** 73,8 ± 2,8*; **T5,5:** 75,5 ± 4,7*. *Excreción biliar de Co:* **C:** 7,95 ± 0,82; **T1,5:** 10,2 ± 1,5; **T2,5:** 13,4 ± 1,9*; **T3,5:** 15,57 ± 0,36**; **T5,5:** 9,5 ± 1,8. *Flujo biliar:* **C:** 1,59 ± 0,20; **T1,5:** 1,31 ± 0,18; **T2,5:** 2,28 ± 0,19**; **T3,5:** 1,99 ± 0,10*; **T5,5:** 1,76 ± 0,14*. (*p<0,05; **p<0,01 respecto de C). **Conclusión:** El tratamiento con Lc en las dosis 2,5; 3,5 y 5,5 mg% produce disminución de Co plasmático, aumenta la viscosidad sanguínea y rigidiza los eritrocitos; aumenta la excreción biliar de Co, de sales biliares y el Flujo Biliar.

GASTROENTEROLOGIA

376. Influencia del glutatión (GSH) en el efecto del aluminio sobre la absorción intestinal de calcio in vivo en la rata. Daniel Orihuela, Verónica Meichtry, Stella Mahieu

Cátedra Fisiología Humana, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe.

Objetivo: se investigó si el efecto del aluminio (Al) sobre el transporte intestinal de calcio tiene alguna posible relación con el nivel intestinal de GSH. **Métodos:** se utilizaron ratas Wistar machos adultas (n=30). En un experimento se trataron ratas con 60 mg Cl₂Al/kg/día o agua desionizada por sobrecarga oral durante una semana. El día del estudio se dividieron en grupos que recibieron: DL-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO) (inhibidor de la γ-glutamylcisteína-sintetasa) 2 mmol/kg i.p 3 h antes, BSO + GSH 100 mg/kg oral 1 h antes o vehículos (C). Se incluyeron dos grupos tratados con etano-hidroxi-difosfonato (EHDP) (inhibidor de la síntesis de 1,25(OH)₂-vitamina D₃) 10 mg/kg/día s.c durante 1

semana que recibieron BSO o su vehículo. Se midió el transporte de calcio (JCa) en segmentos de duodeno-yeyuno ligados *in situ* usando ^{45}Ca como marcador de flujo. En otro experimento se administró a las ratas Cl_3Al vía oral en dosis de 0, 30, 60 y 100 mg/kg/día durante una semana. Se determinó el contenido de GSH (como sulfidrilos no proteicos) y la actividad de γ -glutamyltranspeptidasa (-GT) (método cinético a 25 °C) en la mucosa intestinal. **Resultados:** el tratamiento con BSO anuló la inhibición del JCa por el Al (JCa en mol/10 cm. C: veh.= 8,89 1,26 vs. Al=5,09 0,42, $n = 6$, $P < 0,05$; BSO: veh.= 6,49 0,59 vs. Al=6,09 0,55, NS). La administración de GSH a las ratas inyectadas con BSO tendió a incrementar la inhibición. En los grupos tratados con EHDP no se observó ninguna variación en el JCa. La administración oral de Al disminuyó el contenido de GSH y aumentó la actividad de -GT de la mucosa intestinal en relación con la dosis (GSH: 2,45 0,35; 2,31 0,39; 1,83 0,21 y 1,12 0,22* $\mu\text{mol/g}$. γ -GT: 4,86 0,38; 5,23 0,37; 6,97 0,21* y 6,74 0,22* U.l/g. para Al : 0, 30, 60 y 100 mg/kg, respectivamente.* $P < 0,05$ respecto Al = 0). **Conclusión:** La alteración del GSH intestinal por el Al se explicaría, parcialmente, por el efecto del metal sobre la actividad de enzimas involucradas en las vías metabólicas de GSH, como la γ -GT. La modificación experimental del nivel intestinal de GSH afectó la inhibición por Al del JCa *in vivo* en la rata.

377. Enfermedad Celíaca. Graciela Ortubey*, Mario Sabatini*, Helena Salerni*, Alicia Seijas*, Abraham Lemberg*, Paola Adami*, Alicia Bertoni, Eduardo Segal*

*Unidad de Gastroenterología y Clínica Médica. Hospital 'Carlos G Durand', Universidad Maimónides, Buenos Aires.

Introducción: La enfermedad celíaca (EC) se caracteriza por una anormal sensibilidad del intestino delgado al gluten. Los síntomas clásicos se presentan sólo en 30 a 40% de los casos. **Objetivos:** Investigar acerca de la información que poseen médicos clínicos que asisten a cursos de postgrado (PG) acerca de la (EC) del adulto y sus formas de presentación. **Materiales y métodos:** 100 médicos clínicos, que asisten a cursos (PG) en Cap. Fed. aplicando 1 cuestionario que cumple diferentes aspectos del conocimiento de la EC y las formas de diagnóstico, respondieron: 61%, 34% asistían a cursos de Medicina Interna (MI) y 27% Medicina Ambulatoria (MA). De (MI); 32% habían completado su residencia en Clínica Médica (rc), 82% (PG); 74% respondió que no abordaron el tema en dichos cursos y 76% no leían publicaciones; 39% habían observado la (EC) con mucha frecuencia, 6% con alguna (alg); 47% rara vez; 32% se orientó al diagnóstico por la historia clínica (HC) y 15% por antecedentes familiares (filiar), al especificar signos clínicos (S+); 24% no respondieron (NR) y el resto: diarrea (drea), diarrea crónica, esteatorrea (est), disminución de peso (-p) (MAB) hepatomegalia 25% (NR) si había observado la (EC) asociada (asoc) a otras entidades, 26% (NR) sospecha diagnóstica en un laboratorio de rutina (SDLR). De (MA); 74% completó su (rc), 100% (PG); 25% abordó el tema, 18.5% había leído publicaciones, 11% observó la (EC) con (alg.); 37% por la (HC), 11% por (filiar); (S+), (MAB), (AN), enteritis, (drea), (-p), (est); 20% (NR) (asoc); 17% (SDLR) 20% no respondieron a (asoc), resto (AN), linfoma intestinal y el resto desconocía. **Conclusión:** Solo una pequeña proporción de la muestra hacen diagnóstico de (EC) y para hacerlo espera hallar síntomas clásicos. Esto sugiere una falta de información acerca de (EC) atípica o monosintomática.

378. Enalapril modifica la esteatosis hepática en ratas nefróticas. Jorge Toblli, Cristina Nyberg, León Ferder, Felipe Inserra

Laboratorio de Medicina Experimental. Hospital Alemán & Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Buenos Aires.

La patogenia del cambio graso hepático (CGH) ha sido vinculada recientemente a stress oxidativo (Ox.S). Enalapril (E) ha demostrado interactuar sobre el Ox.S en diferentes tejidos. El objetivo de este estudio fue evaluar el rol de E en relación a CGH en ratas nefróticas (RN) por adriamicina (AD). Machos SD adul-

tos, G1 (n=18) RN; G2 (n=18) RN+E. En ambos Gs. AD 7,5mg/Kg, dosis única IV. Durante 8 semanas G1 con agua común y G2 con E 20mg/L en el agua. Se evaluó: Proteinuria (Up), clearance cr. (Clcr), albuminemia (Alb.), colesterolemia (Col), trigliceridemia (TG), TGO, TGP, bil. total (BT), fosfatasa alc. (Falk), e histología hepática (H&E, oil red), analizando % de hepatocitos con CG (%HCG). Resultados 8va. semana ($x \pm \text{DS}$) G1 vs. G2: 1) Up (mg/día) 365,9 \pm 136 vs. 205,6 \pm 88*; 2) Clcr (ml/min) 0,9 \pm 0,09 vs. 1,2 \pm 0,07*; 3) Alb (g/dl) 2,1 \pm 0,2 vs. 2,6 \pm 0,2*; 4) Col (mg/dl) 398,5 \pm 139,7 vs. 337,7 \pm 118,2; 5) TG (mg/dl) 350,1 \pm 114,8 vs. 297,6 \pm 97,1; 6) TGO (U/L) 581,7 \pm 91,1 vs. 398,1 \pm 60,8*; 7) TGP (U/L) 169,3 \pm 32,4 vs. 87,9 \pm 17,5*; 8) BT (mg/dl) 1,1 \pm 0,5 vs. 0,4 \pm 0,2*; 9) Falk (U/L) 420,8 \pm 91,5 vs. 231,1 \pm 17,4*, 10) % HCG 37 \pm 12,1 vs. 4,2 \pm 5*; * $p < 0,01$ (Mann-Whitney). Correlación (Spearman) 1) %HCG vs. Col en G1 $r = 0,6266$ $p < 0,01$; G2 $r = 0,2829$ $p = 0,2553$; 2) %HCG vs. TG en G1 $r = 0,7278$ $p < 0,01$; G2 $r = 0,1384$ $p = 0,584$. Estos resultados sugieren que E modificaría la evolución del CGH en RN.

379. Mecanismos de incremento del flujo biliar (FB) por silimarina (SIL) en la colestasis inducida por 17 α -etionilestradiol (EE) en la rata. Fernando Crocenzi, Enrique Sánchez Pozzi, José Pellegrino, Emilio Rodríguez Garay, Marcelo Roma.

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

Demostramos previamente que SIL protege de la colestasis inducida por EE mejorando el FB dependiente de sales biliares (FBDSB), en parte al prevenir la disminución del "pool" de SB endógeno. En este estudio, evaluamos el FB independiente de SB (FBISB), determinado como la ordenada al origen de la regresión entre flujo biliar y velocidad de excreción de SB. Se analizó también la capacidad máxima de los sistemas de transporte canalicular (T_m), el paso limitante del transporte de entes osmóticos a bilis, estimando las velocidades máximas de excreción biliar inducidas por infusiones i.v. crecientes de la sal biliar tauroursodesoxicolato (TUDC) y del anión orgánico modelo bromosulfotaleína (BSF). EE (5 mg/kg/día, s.c., 5 días) disminuyó el FBISB, así como el T_m de TUDC y de BSF; la administración simultánea de SIL (100 mg/kg/día, i.p.) previno parcialmente estos efectos (FBISB [$\mu\text{l/min/g híg.}$]: Control: 1,22 \pm 0,08, SIL: 1,26 \pm 0,07, EE: 0,57 \pm 0,05*, SIL+EE: 0,89 \pm 0,10†; T_m de TUDC [nmol/min/g híg.]: Control: 770 \pm 64, SIL: 784 \pm 16, EE: 226 \pm 8*, SIL+EE: 298 \pm 20†; T_m de BSF [$\mu\text{g/min/g híg.}$]: Control: 52 \pm 3; SIL: 53 \pm 5; EE: 21 \pm 1*; SIL+EE: 30 \pm 1†; † $p < 0,05$ vs Control; * $p < 0,05$ vs EE). Concluimos que SIL mejora el transporte canalicular máximo de SB, contribuyendo así a prevenir el deterioro del FBDSB inducido por EE. Dado que el glutatión, principal determinante del FBISB, compartiría con BSF su sistema de transporte canalicular, la mejoría en el T_m de BSF puede contribuir a explicar los efectos beneficiosos de SIL sobre el FBISB.

380. Heterofagia en hepatocitos aislados estudiada con dextran-galactosil umbelliferona (DGU). Efecto de la activación de proteína quinasa C (PKC). María Larocca, Elena Ochoa, Emilio Rodríguez Garay, Raúl Marinelli.

Instituto de Fisiología Experimental-CONICET, Universidad Nacional de Rosario.

La heterofagia, procesamiento de material extracelular, involucra los procesos de endocitosis, transporte vesicular y degradación lisosomal. Estudios previos en hepatocitos indicaron que el activador de PKC phorbol 12-myristato 13-acetato (PMA) inhibe la degradación de proteínas, esto es la actividad de proteasas lisosomales, sin afectar los procesos de captación y transporte hasta lisosomas. En este trabajo se estudió si PKC también media la regulación de otros sistemas enzimáticos lisosomales. Se utilizaron hepatocitos aislados de rata y un nuevo marcador de heterofagia, DGU, que es procesado a nivel lisosomal por β -galactosidasa. Experimentos preliminares utilizando fracciones subcelulares hepáticas conteniendo β -galactosidasa o hepatocitos

incubados con el inhibidor lisosomal cloroquina, mostraron una relación directa entre fluorescencia emitida a 450 nm y actividad β -galactosidasa. Hepatocitos incubados con DGU en presencia de PMA (0,1-1 μ M) no mostraron cambios de fluorescencia (**control**: 157 ± 38 , **PMA**[1 μ M] 224 ± 47 , $n=4$). Experimentos paralelos utilizando otro marcador de heterofagia, [14 C]sacarosa-peroxidasa de rabanito mostraron inhibición dosis dependiente de la proteólisis, que fue prevenida con los inhibidores de PKC cheleritrina (Che) o staurosporina (St), (**control**: 100%, **PMA**[1 μ M]: 60 ± 9 % $p < 0.05$, **PMA**[1 μ M]+**Che**[2,6 μ M]: 97 ± 15 %, **PMA**[1 μ M]+**St**[1 μ M]: 82 ± 9 %). Conclusión: la activación de PKC por PMA en hepatocitos induce inhibición de la actividad de proteasas lisosomales sin afectar la de β -galactosidasa. Nuestros datos sugieren una regulación alta-mente selectiva de la actividad de hidrolasas lisosomales mediada por PKC.

381. Transporte hepático de bromosulfoftaleína (BSF) en la fase aguda de la colestasis por obstrucción parcial coledociana (OPC). Emilio Rodríguez Garay, Patricia Rodríguez, Diana Chiodin, Gerardo Pisani

Instituto de Fisiología Experimental, CONICET, Universidad Nacional de Rosario.

Introducción: En trabajos previos, se comprobó la reversibilidad de las alteraciones de parámetros bioquímicos de colestasis en la fase aguda de OPC. El presente trabajo tiene por objetivos analizar la evolución del transporte hepático del anión orgánico (AO) BSF en la fase aguda de OPC y su relación con cambios histológicos en hígado. **Métodos:** Ratas Wistar machos adultos normales (N) y con OPC de 2,3,4 y 7 días ($n: 5$ a 6 para cada grupo) recibieron BSF (6 mg/100 g, i.v.). Se obtuvieron muestras de sangre de 1 a 30 min y de bilis durante 1 hora. Luego se efectuaron estudios histológicos en hígado. **Resultados:** Se efectuó ajuste biexponencial de las concentraciones plasmáticas de BSF en el tiempo. Por análisis bicompartamental se calcularon las velocidades de transferencia de BSF plasma-hígado (r_{12}), hígado-plasma (r_{21}) e hígado-bilis (r_3). En N, r_{12} tuvo un valor de 0.303 ± 0.040 , r_{21} 0.033 ± 0.011 y r_3 0.055 ± 0.014 . En OPC r_{12} disminuyó a 2 y 3 días ($0.155 \pm 0.022^*$ y $0.167 \pm 0.070^*$), r_{21} aumentó a 2 días ($0.092 \pm 0.018^*$) y r_3 notoriamente a 7 días ($0.173 \pm 0.004^*$). La excreción biliar de BSF alcanzó un máximo a los 20 min sin diferencias entre N y OPC 7 días. Los valores mínimos en OPC fueron a 48 y 72 hs siendo el flujo biliar muy bajo. La histología mostró en OPC aumento del número de conductos en áreas portales (N: 1.32 ± 0.04 ; OPC 48hs: $2.65 \pm 0.18^*$; OPC 7días: $3.39 \pm 0.72^*$) y de la densidad de volumen de áreas portales (cm^3/cm^3) (N: 0.028 ± 0.001 ; OPC 48hs: $0.053 \pm 0.004^*$ y OPC 7 días: $0.056 \pm 0.010^*$) ($*p < 0.05$). **Conclusiones:** En la fase aguda de OPC está regulado el transporte hepático de AO independientemente de la evolución de las alteraciones histológicas propias de la obstrucción biliar.

382. Óxido nítrico y enzimas hepáticas post-trasplante. Noemí Zanaro, María Romero, Horacio Aziz, Oscar Imventarza, Javier Lendoire, Beatriz Sasseti

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires - Hospital Dr. Cosme Argerich, Buenos Aires.

El trasplante hepático (Txh) es hoy de rutina para pacientes con enfermedades hepáticas irreversibles. El óxido nítrico (NO) se libera del endotelio vascular hepático, plaquetas, etc. en respuesta a estímulos como endotoxinas y daño isquemia reperusión (di-r). Sin embargo la relación entre el trasplante y la síntesis y los mecanismos de acción del NO en el di-r aún no se conocen. Se evaluó la posible utilidad del NO para predecir la funcionalidad temprana del injerto en base a su correlación con distintos parámetros de laboratorio. Se estudiaron 10 pacientes, edad: 39 ± 15 años, que fueron sometidos a Txh ortotópico (TxhP). En muestras, antes y después del Txh, se analizaron durante 15 días: NO, usando el reactivo de Griess y creatinina, proteínas totales, albúmina, glucosa, bilirrubina total, GGT, AST, ALT, colinesterasa (CHE) y

fosfatasa alcalina. Post-Txh: a las 96 hs se halló una correlación negativa entre NO (μ M) [mediana; rango] [84; 36-250] y CHE (U/L) [3757; 1782-6185], $r: -0.78$, $p < 0.05$; a las 144 hs se halló una correlación negativa entre NO [79;45-279] y ALT (U/L) [159;54-942], $r: -0.83$, $p < 0.05$. Conclusiones: mientras los niveles de AST y ALT, reconocidos como marcadores de la funcionalidad del injerto, a los 15 días post-Ltx tienden a la normalidad, los de NO se mantienen elevados y sin que se observen diferencias significativas entre muestras a lo largo del tiempo, es decir que el NO no es capaz de predecir la funcionalidad temprana del injerto.

383. Cultivo primario de hepatocitos de rata preservados en solución de la Universidad de Wisconsin (UW). Efecto del tiempo de preservación hipotérmica sobre la eliminación de amonio. Ma Estrella Rodríguez¹, Jesús Pazo¹, Félix Vega¹, Graciela Furno², Edgardo Guibert³, Joaquín Rodríguez⁴

¹ Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, España. ² Estadística, ³ Biología Molecular, ⁴ Farmacología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.

Mediante el cultivo primario se estudiaron los efectos que la preservación hipotérmica (PHT) genera sobre la capacidad de eliminación de amonio de hepatocitos de rata. Para ello se cultivaron (75% MEM-25% Medium 199-10% SFB) hasta 120hs, hepatocitos controles y previamente preservados en sol. UW (4 °C, N₂) (UW48hs, UW72hs y UW96hs). A los tiempos de cultivo establecidos (24-120hs) se determinaron la fijación a placa (FP) (attachment) expresado de acuerdo al contenido de LDH (U/mg prot celular) y la capacidad de detoxificar 500 μ g/dl de NH₄Cl/2x10⁶ hepatocitos en 6hs, calculados como eficiencia de eliminación $EE = (Ci - Cf) / Ci$ (siendo Ci, conc. inicial ($t=0$) y Cf, conc. final de amonio, $t=6$ hs). Los resultados mostraron la utilización de células viables (FP: Control 120hs: 4530 ± 403 , UW72/120hs: 3885 ± 1226 , UW96/120hs: $2727 \pm 546^*$ ($p < 0.05$), $n=6$ placas/grupo). Todos los grupos estudiados mantuvieron una EE mayor al 50%, hasta las 72hs de cultivo, sin diferencias significativas entre hepatocitos preservados y controles (Control 72hs: 0.54 ± 0.07 ; UW48: 0.49 ± 0.08 ; UW72: 0.43 ± 0.11 ; UW96: 0.52 ± 0.16 ; $n=6$ placas/grupo). Estos resultados indican que hepatocitos sometidos a PHT hasta 96hs mantienen su capacidad de depuración de amonio, respecto de los controles cuando son cultivados hasta 72hs y posibilitan su utilización en dispositivos extracorporales (hígado bioartificial) o trasplante.

384. Preservación hipotérmica del hígado en la solución de la Universidad de Wisconsin (UW) y S-Nitroso-glutation (GSNO). Cambios en la morfología hepática. Alejandra Quintana¹, Edgardo Guibert², Angel Scandizzi, Alejandra Martínez¹, Luciana Almada, Joaquín Rodríguez

¹ Morfología, ² Biología Molecular, Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario.

Los cambios morfológicos en el hígado post preservación/reperusión involucran al parénquima y al estroma (citoesqueleto y matriz extracelular). Los hallazgos histológicos y bioquímicos evidencian que la preservación/reperusión y las concentraciones de óxido nítrico en el medio de preservación tienen efectos simultáneos y correlacionados sobre el órgano completo. Se estudió el efecto de la adición de GSNO (50, 100, 250 y 500 μ M) a la preservación (solución UW-48hs.-4°C) en hígados de ratas Wistar, posteriormente reperfundidos durante 1 hora en un sistema aislado con Krebs-Henseleit/Alb. bov. 2%. En biopsias obtenidas finalizada la reperusión, se estudió el parénquima hepático (con hematoxilina/eosina) y el estroma (Picrosirius red para colágeno I y III y coloración con sales de Plata para reticulina). A las 48 hs, en el grupo UW se observó extensa vacuolización centrolobulillar con zonas portales normales, blebs y hepatocitos balonizados. Las fibras de reticulina y colágeno I y III mostraron cierta desorgani-

zación y disminución. De los grupos preservados con GSNO, el UW+100 μ M GSNO mejoró la histología conservando la arquitectura hepática, disminuyendo el desprendimiento endotelial y evidenciando una vacuolización mínima. Las tramas reticulares y colagénicas tendieron a normalizarse. Observamos que con la dosis 100 μ M GSNO se preserva la integridad del parénquima y del estroma hepático revirtiendo así, en gran parte, el daño por reperfusión.

385. Glutacion y Metionina mejoran la viabilidad de hepatocitos sometidos a preservación hipotérmica/reoxigenación. María Mamprin, Joaquín Rodríguez, Edgardo Guibert¹

¹ *Biología Molecular. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario.*

En este trabajo se analizaron diferentes estrategias para evitar la pérdida de Glutacion (GSH) que se produce cuando se reoxigenan hepatocitos de rata (HC) que fueron preservados en hipotermia. Pérdida que afecta la viabilidad funcional de los mismos. Los HC fueron preservados en sol. de la Univ. de Wisconsin

(72 hs, 4°C, N₂), lavados dos veces con solución de lavado (SL) Krebs-Henseleit (KH) y luego reoxigenados en sol. de reoxigenación (SR) (120 min, 37°C, carbógeno). Se determinó el contenido celular de GSH (nmol/10⁶cél), posterior al lavado de las células con las siguientes SL: **a)** KH; KH más **b)** GSH 3 mM, **c)** GSH 80 μ M y **d)** GSH 3mM+Metionina (**M**) 1mM. Se determinó que la sol. **b** mostró un mayor contenido de GSH (50.5 \pm 3.9 vs (**a**) 12.7 \pm 2.5) (Anova, *p<0.05). Luego los HC del grupo **b** se reoxigenaron en las siguientes SR: **1)** KH; KH más **2)** GSH 3mM, **3)** GSH 80 μ M, **4)** M 1mM y **5)** GSH 80 μ M+M 1mM. Cada 20 min., en alícuotas se determinó: la exclusión de azul tripán, la liberación de láctico deshidrogenasa (LDH %) y el contenido de GSH. El grupo **4** mostró a los 120 min. una mejor conservación de GSH (28,4 \pm 5.1 vs (**1**) 0.23 \pm 0.11) y una menor liberación de LDH (11.3 \pm 2.9 vs (**1**) 18.6 \pm 2.2) (Anova, *p<0.05). Se concluye que el agregado de GSH 3 mM a la SL evita la pérdida de GSH que se produce cuando los HC pasan de una situación de hipotermia/anoxia a la normotermia y que el agregado de **M** 1 mM a la SR mejora la viabilidad celular, probablemente porque inhibiría el eflujo de GSH.