

RESUMENES DE LAS COMUNICACIONES

ENDOCRINOLOGIA I

1. Regulación del crecimiento de células de granulosa por factores provenientes del ovocito. GM Lanuza, ML Fischman y JL Barañao.

IByME y Depto.Qca.Biológica, FCEyN, Universidad de Buenos Aires.

Si bien las gonadotropinas cumplen un papel central en el control del desarrollo folicular, sus acciones están moduladas por esteroides y por factores peptídicos intraováricos. En el presente trabajo hemos estudiado el rol del ovocito como regulador de la función de las células de la granulosa. Se utilizó un modelo de células de granulosa de ratas inmaduras tratadas con DES y cultivadas en medio libre de suero. Se realizaron ensayos utilizando ovocitos de rata o bovinos provenientes de folículos de 2-8 mm de diámetro. Se co-cultivaron células de granulosa de rata con número creciente de ovocitos bovinos en ausencia o presencia de FSH. Los ovocitos estimularon la síntesis de ADN en las células de la granulosa en forma dependiente de su número y este efecto se vio amplificado en presencia de FSH (Control: 615 ± 20 , Ovocito (15/celda): 7.200 ± 150 , FSH: 630 ± 30 , FSH+Ovocitos: 10.370 ± 600 cpm/celda). El medio condicionado por ovocitos no reprodujo el efecto, lo que podría indicar la necesidad de una interacción bidireccional entre el ovocito y las células de la granulosa. Por otra parte ovocitos madurados *in vitro* no produjeron el mismo efecto. La acción estimuladora de los ovocitos no fue neutralizada por anticuerpo anti-TGF β y se observó además en presencia de dosis máximas efectivas de TGF- β o TNF- α , indicando que ninguno de estos factores (cuya producción por ovocitos ha sido demostrada) es el responsable de las acciones. Similares resultados se obtuvieron utilizando ovocitos de rata. Estos resultados aportan evidencias de que el ovocito cumple un papel activo en la regulación de la función folicular.

2. Interacción entre TGF- β y Folistatina en células de la granulosa. PE Saragüeta, AA Colman-Lerner, GM Lanuza, ML Fischman y JL Barañao.

IByME y FCEN, Universidad de Buenos Aires.

Aunque TGF- β y activina son factores de la misma familia de péptidos, afectan en forma diferente la función de las células de la granulosa. Con el objetivo de determinar el efecto de TGF- β sobre la expresión de la proteína ligadora de activina, Folistatina (FSP) en células de la granulosa bovinas, se aislaron las células de folículos de tamaño intermedio (3-5 mm) y se cultivaron

en presencia de TGF- β 1 (5ng/ml) o dibutiril AMPc (AMPc 1mM). El ARNm de FSP fue detectado por RT-PCR, usando primers elegidos de la secuencia bovina. La banda correspondiente a un fragmento de 443 pb se observó solamente en las células tratadas con AMPc y TGF- β , luego de 24 hs. de cultivo. Northern blots realizados con una sonda de cDNA de FSP bovina, presentaron dos bandas correspondientes a 2.8 y 1.8 Kb cuya intensidad aumentó en los tratamientos con AMPc (1,3 veces) o TGF- β (2,0 veces). Por otra parte, concentraciones entre 1-10 ng/ml de FSP produjeron una marcada inhibición en la incorporación de 3 H-Timidina inducida por TGF- β en células de la granulosa de rata (Control: 500 ± 55 ; TGF- β : 3000 ± 142 ; FSP (10ng/ml): 190 ± 30 ; TGF- β + FSP: 900 ± 56 cpm/well). Concluimos que TGF- β podría estar involucrado en el control de la expresión de FSP durante el desarrollo folicular. La FSP podría modular algunas de las acciones de TGF- β sobre células de la granulosa.

3. Regulación de la luteinización folicular por un análogo de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH): Relación entre esteroidogénesis y apoptosis. C Andreu, F Parborell, S Vanzulli y M Tesone.

Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Tratamientos prolongados con análogos de GnRH son utilizados en la clínica para suprimir la secreción endógena de gonadotropinas, sin embargo estos análogos ejercen un efecto directo sobre el ovario. El objetivo de este trabajo fue estudiar la acción del análogo de GnRH acetato de leuprolide (LA) sobre esteroidogénesis y apoptosis ovárica. Se inyectó LA (1 μ g/rata/día) a ratas prepúberes superovuladas con PMSG/hCG. Se aislaron cuerpos lúteos por microdissección y se incubaron durante 3 hs con LH (100 ng/ml) o dibutiril AMPc (dAMPc 1 mM). Se midió la progesterona producida observándose una disminución en el grupo LA tanto de la producción basal como en respuesta a LH (Basales= Control C: $96,6 \pm 9,6$; LA: $22,9 \pm 2,8$; LH= C: $145,7 \pm 4,9$; LA: $23,6 \pm 2,0$ ng/ml, $p < 0,001$). En cambio el dAMPc estimuló significativamente en ambos casos (C: $153,9 \pm 11,8$; LA: $83,15 \pm 8,2$). El AMPc producido fue menor en cuerpos lúteos del grupo LA y no fue estimulado por LH (Basales= C: $7,29 \pm 1,6$; LA: $1,17 \pm 0,6$; LH= C: $13,2 \pm 0,4$; LA: $2,5 \pm 0,4$ ng/ml, $p < 0,01$). El contenido proteico por cuerpo lúteo fue semejante en los dos grupos. Por otro lado, considerando que en cortes histológicos de ovarios de ratas tratadas con LA encontramos mayor cantidad de

foliculos atrésicos y menor de cuerpos lúteos, hemos determinado la cantidad de células apoptóticas. Se tomó como criterio la presencia de cuerpos apoptóticos y núcleo en medialuna, detectándose un número mayor en el grupo LA. Este resultado fue confirmado por inmunohistoquímica (TUNEL). Se concluye que LA produce en el ovario una falla en el sistema receptor de LH-adenilato ciclase y un aumento de la apoptosis celular.

4. La Conexión Utero-Ovarica es Indispensable para una Esteroidogénesis y Puesta Ovular Normales en la Mona Cebus. CA Nagle, M Lahoz, M Torres, L DiGiano, S Quiroga AF Mendizabal.

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

En el primate *Cebus* la desconexión de un ovario respecto del útero, por sección del ligamento utero-ovarico (LUO), interrumpe la alternancia ovulatoria y altera la función del ovario contralateral. En el presente estudio se determinaron los efectos de la desconexión ovarica bilateral y reanastomosis ovario-ovarico, excluyendo al útero, por unión de ambos LUOs. En 4 hembras *Cebus apella* adultas se seccionaron ambos LUOs a nivel de su inserción en útero y se anastomosaron entre sí sin modificar la irrigación utero-ovarica. Se determinaron los niveles de estradiol (E) y progesterona (P), antes y después de la maniobra y en forma diaria en ciclos alternos por un periodo de 24 meses. Se realizaron laparoscopias seriadas para observar el desarrollo folicular y puesta ovular. Al final del estudio, en 2 animales se realizó una fijación por perfusión intracardiaca de formol 4% en buffer bajo anestesia profunda y se realizaron cortes para evaluación histológica de los ovarios. La anastomosis en fase folicular indujo, dentro de la hora, un descenso del $55 \pm 8\%$ del E plasmático, sin modificar la P circulante, bloqueó la puesta ovular e interrumpe el ciclo en curso. En fase lútea, la maniobra determinó luteolisis, con un descenso del $35 \pm 4\%$ de P. Los ciclos posteriores se caracterizaron por desarrollo folicular incompleto, luteinización folicular, anovulación y valores subnormales de E y P. Los cortes histológicos revelaron múltiples quistes foliculares y extensa luteinización folicular. Los resultados sugieren que, en los primates, el bloque utero-ovarico es una unidad funcional de cuya integridad depende la normalidad de la función ovarica.

5. Identificación de neurofilamentos en el ligamento uteroovárico y su proyección al endometrio en la mona cebus. CA Nagle, L DiGiano, M Lahoz, D Busso, S Quiroga, AF Mendizabal.

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

El ligamento utero-ovarico (LUO) parece estar involucrado en la conducción de la información que determina la alternancia ovulatoria en el primate *Cebus*. Estudios previos demostraron que la estimulación

eléctrica de esta estructura modifica la secreción esteroidea ovarica y altera la ruptura folicular. Con el objeto de determinar la presencia y trayectoria de neurofilamentos en el LUO, se procesaron cortes seriados comprendidos entre el útero y ovarios, provenientes de 3 primates *Cebus apella* adultas con ciclos menstruales regulares. Cortes flotantes fueron expuestos a una dilución 1:1000 de un anticuerpo monoclonal específico para la localización de epitopos no fosforilados de subunidades de 68 a 200 kDa de proteínas de neurofilamentos. Los cortes fueron expuestos a un 2do anticuerpo unido a estreptavidina-peroxidasa y revelados con diaminobencidina-níquel. Cortes adicionales fueron incubados con un anticuerpo monoclonal anti-tirosina hidroxilasa o procesados por histoquímica según Backs y Amarol para acetilcolinesterasa. Los resultados revelan la presencia de abundantes neurofilamentos en todo el trayecto del LUO y penetrando al útero hasta la región basal del endometrio. Los neurofilamentos mostraron una estrecha vinculación a las estructuras vasculares formando redes periarteriolas sin penetrar el estroma ovarico. Las reacciones de marcación catecolaminérgica y colinérgica resultaron negativas. Las altas concentraciones de proteínas constitutivas de neurofilamentos en el LUO sugieren la existencia de un sistema neuronal, no catecolaminérgico, no colinérgico, que podría participar en la conducción de la información que determina cambios en la función ovarica en respuesta a estímulos eléctricos o sección del LUO.

6. Participación de la proteína epididimaria DE en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito en el ratón. DJ Cohen, PS Cuasnicu.

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

La glicoproteína epididimaria de rata DE (37 kDa) se asocia al espermatozoide (ES) durante la maduración y participa en la fusión de gametas a través de sitios complementarios en la superficie del ovocito. Dado que DE presenta un 70% de homología con una proteína epididimaria de ratón y que recientemente hemos detectado la presencia de DE sobre el ES de esta especie, el objetivo del presente trabajo fue investigar la participación de DE en el proceso de fusión de gametas en el ratón. Para ello, ovocitos sin zona pellúcida fueron incubados con ES capacitados en presencia de DE u ovoalbumina como control. Bajo estas condiciones, DE produjo una inhibición significativa ($p < 0,001$) y dependiente de la concentración, en el porcentaje de ovocitos penetrados respecto a los controles (Max: 200 $\mu\text{g/ml}$: 26% vs 87%). Esta inhibición no se debería a un efecto de DE en la unión del ES al ovocito, ya que no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de ovocitos con ES unidos (100% vs 97%) ni en el No. de ES unidos/ovocito (13 vs 12). Estos resultados indicaron la existencia de sitios complementarios para DE en la superficie del ovocito de ratón, los cuales fueron detectados por inmunofluorescencia indirecta en la región fusogénica del ovocito. Dado que es sabido que el proceso de fusión en el ratón involucra la interacción de una

desintegrina del ES a una integrina del ovocito, y que DE no presenta dominios de desintegrina, estos resultados constituirían la primera evidencia sobre la co-existencia de más de un mecanismo molecular en el proceso de fusión de gametas.

7. Evidencias farmacológicas de la participación de la óxido nítrico sintasa (NOS) en la reacción acrosomal inducida por progesterona en el espermatozoide murino. MB Herrero, JM Viggiano, S Pérez Martínez, MAF Gimeno.

(CEFYBO-CONICET), Buenos Aires.

En trabajos anteriores localizamos por inmunofluorescencia indirecta la NOS en el acrosoma del espermatozoide murino y observamos que inhibidores de la NOS reducen el porcentaje de fertilización *in vitro* en el ratón. Estos resultados nos llevaron a investigar la participación de la NOS espermática en la reacción acrosomal inducida por progesterona. Los espermatozoides se capacitaron durante 90 min y luego se adicionaron inhibidores de la NOS: N^G-Nitro-L-arginina (l-name) ó L-N^G-nitro-arginina (NO₂-arg). A los 120 min se agregó 15: M de progesterona durante otros 15 min. En otro grupo experimental, se adicionó un generador de NO durante otros 15 min a espermatozoides capacitados. Los resultados se expresan como porcentaje de espermatozoides reaccionados y cada valor es la media de 5 experimentos. La progesterona (P) aumentó el porcentaje de espermatozoides reaccionados (control: 28% ± 1,63 vs P: 47% ± 1,6; P < 0,05), mientras que L-NAME y NO₂-arg inhibieron la reacción acrosomal inducida por progesterona (control: 28% ± 1,63, P: 46% ± 1,8 vs L-NAME: 33% ± 1,5 y NO₂-ARG: 34% ± 2,1, p < 0,01). Por otro lado, el generador de NO (Sp) estimuló directamente la reacción acrosomal (control: 29 ± 1,6 vs Sp: 45% ± 1,7, P < 0,01). Estos resultados sugieren que la NOS del espermatozoide es necesaria para que la progesterona induzca la exocitosis acrosomal *in vitro* en el ratón.

8. Estudio de la cubierta vitelina en la fecundación en *Bufo Arenarum*. Gustavo A. Barisone y Marcelo O.

Cabada - PROMUBIE - Fac. Cs. Bioq. y Farm. - UNR - (2000) Rosario, Argentina.

El ovocito está rodeado por una serie de cubiertas formadas en el ovario y en el tracto genital femenino. Estas cubiertas están implicadas en la fecundación. En los anfibios los ovocitos están rodeados por la cubierta vitelina (CV), una estructura glicoproteica análoga a la zona pelúcida de mamíferos, y por una cubierta gelatinosa. La síntesis de los componentes de la CV ha sido adjudicada al ovocito, a las células foliculares o a ambos en distintas especies. En este trabajo se estudia el origen de los componentes de la cubierta vitelina de *Bufo arenarum* y su participación en la fecundación. Por medio de hibridizaciones *in situ* con anticuerpos policlonales contra cubierta vitelina, se observa reconocimiento tanto en el ovocito como en las células

foliculares, incluso antes de que pueda observarse cualquier tipo de componente estructural por microscopía electrónica. Mediante fecundación *in vitro* se observó inhibición de la fecundación en medios con anticuerpos anti-CV, que resultó proporcional a la concentración del antisero. Con respecto a controles (100% fecundación) se observaron valores de 0.6 ± 1.6%, 8.2 ± 7.5%, 51.9 ± 22.6% y 72.3 ± 32.3% de fecundación en medios con anti-CV dilución 1/10, 1/50, 1/200 y 1/1000 respectivamente. En medios con suero pre inmune se observó un 92.6 ± 23.4% de fecundación. Analizados por un test t-Student no apareado, los tres primeros valores fueron significativamente distintos del valor para suero pre-inmune. Los resultados descriptos sugieren que tanto el ovocito como las células foliculares participan en la formación de la cubierta vitelina en *Bufo arenarum*. Esta cubierta tiene un rol importante en la fecundación como lo demuestran ensayos de inhibición.

9. Detección de una proteína acrosomal de espermatozoides de *Bufo Arenarum* que interacciona con cubierta vitelina del ovocito. María Laura Martínez y Marcelo Cabada.

Facultad de. Cs. Bioq. y Farm. U.N.R. (2000) Rosario, Argentina.

El proceso de fecundación implica un reconocimiento específico entre gametas. En *Bufo arenarum* no se conocen los ligandos de unión del espermatozoide al ovocito. En el presente trabajo se han separado distintos compartimentos sub-celulares del espermatozoide. Proteínas de dichos compartimentos se han inmovilizado en membranas de nitrocelulosa y fueron incubadas con cubierta vitelina (estructura glicoproteica del ovocito análoga a zona pelúcida de mamífero). Sólo la fracción que corresponde al acrosoma da reacción positiva cuando se revela con anticuerpos anti-cubierta vitelina, indicando que en estos casos hay interacción. A partir de estos resultados se realizaron incubaciones del acrosoma con cubierta vitelina. Luego de separar los componentes acrosomales no unidos, se detectó por PAGE la presencia de una proteína minoritaria en acrosoma, de 110 kDa, que evidencia interacción. El contenido del acrosoma se utilizó para producir anticuerpos y la especificidad ha sido comprobada por inmunocitoquímica. Dicha proteína es detectada, en análisis por Western Blot, por el anticuerpo anti-matriz acrosomal y no aparece en otros tejidos como lo evidencia el mismo análisis. Si bien su rol biológico todavía no ha sido elucidado, los resultados sustentan la existencia de una interacción específica con cubierta vitelina.

10. Purificación y caracterización de una glicoproteína tipo mucina presente en secreción de oviducto y asociada a cubierta gelatinosa de ovocitos de *Bufo arenarum*. S Arranz, I Albertali, M Cabada.

PROMUBIE. Fac. de Cs. Bioq. y Farm. U.N.R. Rosario, Argentina.

Los ovocitos de anuros están rodeados por la envoltura vitelina y las cubiertas gelatinosas. Estas últimas se forman en el oviducto y se depositan sobre los ovocitos en su tránsito por el mismo. Recientemente hemos purificado dos proteínas altamente glicosiladas de secreción de oviducto de *Bufo arenarum*, de PM aprox. 400.000 (HGP) y 120.000 (L-HGP) respectivamente. Se ha observado, por Western blot, la presencia de ambas glicoproteínas en las cubiertas gelatinosas de ovocitos de ovisaco. L-HGP se encuentra también presente en el difundido total obtenido por incubación en soluciones acuosas de los ovocitos depuestos. Utilizando las lectinas WGA, Con A y PNA se caracterizaron los restos glicosídicos de las glicoproteínas de secreción así como de tejido de las distintas porciones de oviducto: pars recta, pars pre convoluta y pars convoluta. Los resultados obtenidos para HGP fueron coincidentes con los surgidos del análisis de la composición de carbohidratos (NAcGal, Gal, Fuc, NAcGlu, NAcNeu). La ausencia de manosa sugiere una proteína central exclusivamente glicosilada en O. HGP es una típica glicoproteína tipo mucina, constituida por un único tipo de subunidad de alto peso molecular que tiende a formar grandes agregados por uniones S-S. Hemos demostrado que HGP no interactúa covalentemente con L-HGP ni con las otras proteínas de secreción. El 70% de su peso corresponde a carbohidratos. La alta resistencia a la digestión con proteasas concuerda con el alto grado de glicosilación. Al igual que otras mucinas, el 80% de los aminoácidos presentes en HGP son T, S, P, V, A y L (más del 50% son S y T únicamente).

11. Dinámica de activación partenogenética en ovocitos maduros de *Calomys laucha* y *Calomys musculinus* (Rodentia-Sigmodontinae). A Lasserre, AD Vitullo.

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos. Serrano 669, 1414, Buenos Aires.

El desarrollo embriológico en mamíferos está regido por los genomas materno (M) y paterno (P) que desempeñan funciones diferentes y complementarias. La función específica del genoma M puede analizarse por medio de la activación y desarrollo partenogenéticos. Más aún, el estudio comparativo de la partenogénesis, en especies filogenéticamente emparentadas, permite aproximarse al significado evolutivo de la funcionalidad diferencial de los genomas M y P. Con este objetivo central se inició el análisis del desarrollo partenogenético en *C. laucha* (Cl) y *C. musculinus* (Cm). Para distintos tiempos de incubación se analizó la capacidad inductiva de activación partenogenética del etanol y del SrCl₂ en ovocitos con y sin cúmulo. El rendimiento óptimo de activación para el etanol se logró con 5 min de incubación para ovocitos sin cúmulo, alcanzándose una frecuencia de activación del $93,07 \pm 4,17$ en Cl y $93,75 \pm 9,18$ en Cm. La incubación óptima para el SrCl₂ fue de 60 min, en ovocitos sin cúmulo, y resultó porcentualmente inferior al etanol: $88,43 \pm 11,5$ en Cl, y $74,28 \pm 9,86$ en Cm. Si bien la respuesta cuantitativa a la activación partenogenética con etanol y SrCl₂ fue semejante en

ambas especies, los tipos de partenogénesis obtenidos en una y otra fueron distintos. Por último la capacidad de desarrollo in vitro de los partenogénesis de Cl fue superior, alcanzando los estadios de mórula y blastocisto temprano aún en condición haploide.

RENAL I

12. El hipotiroidismo (HT) afecta la producción renal de dopamina (DA). JA Del Compare, J Aguirre, *F Ibarra, M Barontini, I Armando.

*Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE), Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez. *Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari. Universidad de Buenos Aires.*

Hemos demostrado que los glucocorticoides modifican la actividad del sistema DOPA/DA renal, que participa en la regulación de la excreción de Na⁺. Este trabajo evalúa el efecto del hipotiroidismo sobre la actividad de este sistema. Se utilizaron ratas Wistar macho de 3 meses tiroidectomizadas (HT, n=14) 45 días antes y sham (S, n=17). Se recolectó orina de 24hs para determinación de Na⁺ y DOPA, noradrenalina (NA), adrenalina (A), dopamina (DA), dihidroxifenilglicol (DHPG) y ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) por HPLC con detección electroquímica. Los animales se mataron por decapitación, se recolectó sangre para determinación de T4 para certificar el hipotiroidismo y de DOPA, DA y DOPAC y se extrajeron los riñones para determinación de ATPasa. Las HT presentaron una disminución significativa ($p < 0,03$) de Na⁺ ($1,00 \pm 0,14$ vs $1,35 \pm 0,11$ mEq/24hs), DA (4650 ± 423 vs 7334 ± 1239 ng/24hs), DOPA (334 ± 69 vs 599 ± 122 ng/24hs), DHPG y DOPAC urinarios. La DOPA (HT: 455 ± 74 ; S: 360 ± 72 pg/ml), DA (HT: 509 ± 84 ; S: 437 ± 89 pg/ml) y DOPAC plasmáticos fueron similares en ambos grupos. La actividad de ATPasa en membranas de corteza renal fue menor ($p < 0,01$) en las HT ($8,80 \pm 1,24$ vs $20,85 \pm 1,97$ μ moles Pi/mg prot/h). Estos datos muestran que en el hipotiroidismo está disminuida la producción renal de DA y la excreción de Na⁺ sugiriendo una posible regulación de la producción de DA renal por las hormonas tiroideas. Este trabajo fue subsidiado por la Fundación Roemmers.

13. Efecto protector del verapamil (Vp) sobre alteraciones glomerulares provocadas por el HgCl₂. G Girardi, E Saball, M Salvarrey y MM Elías.

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

Anteriormente demostramos un compromiso glomerular en la nefrotoxicidad del HgCl₂ (Hg) (5 mg/kg.s.c.). La administración de Vp (75mg/kg.i.v) a ratas antes del tratamiento con Hg evita las alteraciones renales funcionales y bioquímicas observadas a la hora, sugiriendo un componente isquémico en este cuadro. El objetivo de

este trabajo fue estudiar si Vp protege de los daños estructurales glomerulares producidos por HgCl_2 . Los grupos experimentales fueron: C, Vp, Hg y Vp+Hg. Se realizaron evaluaciones mediante microscopía óptica, fluororometría, ELISA, espectrofotometría e inmunohistoquímica. El área de sección de superficie glomerular (SSG), el contenido de Ca^{2+} glomerular y los niveles de mieloperoxidasa en glomérulos (MPO) en el grupo Vp+Hg no difirieron de los grupos controles (SSG (m^2): $C=26310 \pm 2545$, $Hg=18478 \pm 1828$, $Vp+Hg=28281 \pm 4654$); Ca^{2+} (nmoles): $C=23 \pm 6$, $Hg=43 \pm 7$, $Vp+Hg=18 \pm 5$); MPO (U/ mg prot): $C=59 \pm 7$, $Hg=134 \pm 10$, $Vp+Hg=79 \pm 11$). Los glomérulos de ratas Vp+Hg mostraron contenidos de fibronectina (Fn) no diferente de los controles (Fn (%prot total): $C=2,4 \pm 0,9$, $Hg=16,6 \pm 6,4$; $Vp+Hg=3,1 \pm 0,9$). Vp no produjo alteraciones sobre los parámetros estudiados. Podemos concluir que Vp protegió del daño glomerular provocado por el HgCl_2 . Estos datos corroborarían la existencia de un componente isquémico antes descrito.

14. Rol del hígado en la nefrotoxicidad de paracetamol (APAP) en ratas. L Trumper, LA Monasterolo y MM Elías.

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

Nuestro objetivo fue evaluar si la nefrotoxicidad de APAP se asocia a la formación en hígado de metabolitos nefrotóxicos y a su procesamiento por la gGT renal. Se estudió además la contribución de la vía de excreción biliar de estos metabolitos en la nefrotoxicidad de APAP. Con animales en jaulas metabólicas se estudiaron los siguientes grupos: i) APAP 1000 mg/kg, ip, (APAP, $n=4$), ii) acivicina 20 mg/kg ip, (Aciv, $n=4$), iii) acivicina 20 mg/kg 1 hora antes que APAP (Aciv+APAP, $n=4$) y iv) controles (C, $n=5$). Se recolectó orina durante 16 horas, luego se extrajeron sangre, los hígados y riñones. Acivicina inhibió la actividad de γ GT renal ($C=256 \pm 19$, $Aciv=32,3 \pm 3,8$ U/g tej.). APAP disminuyó el glutatión (GSH) hepático ($C=3,83 \pm 0,12$ APAP= $2,51 \pm 0,34$, $Aciv+APAP=2,89 \pm 0,86$ mmol/g tej.) pero no el renal. El tratamiento dual mejoró el filtrado glomerular ($C=0,77 \pm 0,01$, $APAP=0,11 \pm 0,04$, $Aciv+APAP=0,61 \pm 0,12$ ml/min.100g), disminuyó la creatinina y urea plasmática ($C=0,37 \pm 0,05$, $APAP=1,88 \pm 0,2$, $Aciv+APAP=0,89 \pm 0,34$ g/l), y hubo una tendencia a disminuir la excreción de proteínas y glucosa y la aparición de células y cilindros granulados en orina respecto de los animales que sólo recibieron APAP. No se modificaron los niveles plasmáticos y urinarios de APAP ni la actividad urinaria de β NAG. Se estudió la función renal, a la hora de la administración de APAP, en un grupo de animales a los que previo a la intoxicación se les colocó una fístula biliar al exterior. No se observaron diferencias en los efectos renales de APAP entre las ratas canuladas o no. Los resultados indicarían que los GSH-conjugados formados en hígado serían en parte responsables de los efectos nefrotóxicos de APAP. Se sugiere el flujo sinusoidal de los conjugados. $p < 0,05$; $p < 0,01$ vs control.

15. Excreción de úrea (U) en un odelo de rata hiperuricosúrica (HU). JE Toblli, NL Yeyati, C Nyberg, M Angerosa, P Pagano.

Lab. Med. Exp. Hospital Alemán. Cát. Fisiol. Med. Universidad de Buenos Aires.

Ante la posibilidad de que la U sea secretada en el riñón en "pars recta del túbulo proximal", y con la evidencia del trasporte a ese nivel del ac. úrico (AU), el motivo de este trabajo es demostrar la probable relación entre el manejo tubular de U y AU en rata HU. SD machos (Fac. Cs. Vet. U.N.L.P.) (250-300g), G1 control ($n=9$) y G2 exp. ($n=9$), G1 con alimento standard. G2 con un preparado de alimento standard más 2% ácido oxónico y 3% de AU. Ambos grupos con agua común "ad libitum". El experimento duró 4 semanas. Días 1 y 28 se determinaron en orina: creatinina (cr), U, osmolalidad, AU, PO_4 , Na, K, Cl, citrato. Los animales al finalizar la cuarta semana fueron nefrectomizados para patología y sacrificados, previa muestra de sangre. Se utilizó t-test, $\alpha=0,05$. Día 1 (basal) no hubo diferencias en las excreciones urinarias. Día 28 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) peso (g) $G1=307 \pm 18$; $G2=282 \pm 5$ (NS). En sangre Hto. (%) $G1=46,7 \pm 0,2$; $G2=46,9 \pm 0,3$ (NS); cr. (mg/dl) $G1=0,7 \pm 0,1$; $G2=0,9 \pm 0,1$ (NS); U (mg/dl) $G1=37,1 \pm 1,8$; $G2=39,1 \pm 1$ (NS); AU (mg/dl) $G1=1 \pm 0,06$; $G2=2,6 \pm 0,4$ ($p=0,006$). En orina cr (mg/g.rat/día) $G1=32,1 \pm 1,2$; $G2=33,7 \pm 1,1$ (NS); U (mg/g.rat/día) $G1=1,22 \pm 0,04$; $G2=1,46 \pm 0,02$ ($p=0,001$), AU (mg/g.rat/día) $G1=7,3 \pm 0,7$; $G2=22,1 \pm 3,7$ ($p=0,004$). Día 28 Excreción Fraccional (EF%) AU $G1=13,6 \pm 2$; $G2=27,5 \pm 4,9$ ($p=0,025$); U $G1=68,1 \pm 8,2$; $G2=106,1 \pm 8,1$ ($p=0,005$). Concluimos: 1) $G2$ presentó mayor EF% con respecto a $G1$, tanto AU ($p=0,025$), como U ($p=0,005$). 2) Se destaca que el aumento de la EF% de U, fue significativamente mayor que el incremento de la EF% de AU, 3) Estos resultados sugieren la posibilidad de que la secreción de U se haga por vías comunes para ambas sustancias, a nivel del segmento del túbulo proximal, donde se sabe que el AU es secretado.

16. Posibles mecanismos a través de los cuales el aluminio modifica los movimientos de Pi en riñón. S Mahieu, ML Calvo.

Fisiología Humana. Facultad de Bioquímica y Cs Biológicas. UNL Santa Fe.

En estudios previos hemos observado un aumento en la reabsorción tubular máxima de Pi por acción del aluminio, en ratas sometidas a intoxicación crónica. Nuestro objetivo fue indagar a través de qué mecanismos podría actuar dicho elemento. Ratas Wistar macho fueron distribuidas en dos grupos: Control (C) $n=10$ e intoxicadas con hidróxido de aluminio por vía i.p. (T) $n=16$ (80 mg/Kg de peso, 3 veces por semana por 5 meses). Al fin de dicho período los animales no mostraron diferencias significativas en los niveles de fósforo: (C) $6,08 \pm 0,42$ mg% (T) $7,09 \pm 0,31$ mg% y calcio plasmáticos: (C) $8,45 \pm 0,17$ mg% (T) $8,79 \pm 0,12$ mg%. El tratamiento no produjo modificaciones en los niveles de bicarbonato plasmático: (C) $22,05 \pm 1,05$ mM (T)

$21,58 \pm 0,25$ mM, ni en la ingesta semanal de alimentos. Se determinó AMPc nefrogénico por RIA en orina de 24 hs observándose una disminución significativa ($p < 0,05$) en (T) $44,16 \pm 3,75$ pm/min vs (C) $91,07 \pm 7,19$ pm/min. Dado que no se observan modificaciones sistémicas postulamos que el efecto renal del aluminio podría estar asociado a una disminución en la capacidad fosfatúrica de PTH, si bien no pueden descartarse otros factores como un déficit en la producción de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

17. **Aislamiento de un inhibidor de la 5-aminolevulico dehidrasa a partir de plasma de pacientes hemodializados.** M. Guolo¹, C. Machalinski^{2*}, M. Biscoglio³, A. M. Stella⁴, C. Franco⁵, L. Pataro⁶, y A. M. del C. Batlle⁷

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP) -Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET); Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.* IQUIFIB (UBA-CONICET), Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.** Instituto Argentino de Riñón y Transplante. Argentina.

Se ha descripto que el plasma de pacientes hemodializados inhibe la actividad de láctico dehidrogenasa sérica, lipoproteína lipasa de tejido adiposo, Na^+/K^+ ATPasa intestinal y adenilato ciclase de riñón bovino. Nuestro objetivo es demostrar que el plasma de pacientes hemodializados también inhibe la actividad de la 5-aminolevulico dehidrasa (ALA-D) de glóbulos rojos (GR). Hemos demostrado que la inhibición es dependiente de la cantidad de plasma presente en el sistema de incubación. La tripsinización, el calentamiento y el tratamiento con TCA del plasma de pacientes hemodializados, hacen desaparecer tal efecto. Para determinar si el factor responsable de la inhibición del ALA-D es de naturaleza peptídica y tratar de aislarlo para estudiar la cinética de inhibición, el plasma se cromatografió por Sephadex G-100. Después de la cromatografía se observaron diferentes fracciones con capacidad inhibitoria. SDS-PAGE del material que contenía la mayor actividad inhibitoria permitió aislar una proteína de 56.2 Kda, que se electroeluyó y ensayó su acción inhibitoria sobre la actividad del ALA-D. La inhibición fue no-competitiva, $K_i = 0,012$ mM. Se determinó la composición de aminoácidos del factor, el análisis de microsecuenciación mostró el N-terminal bloqueado. Se propone que este péptido de 56.2 kDa se considere como una toxina urémica, y se emplee como parámetro bioquímico durante el tratamiento de hemodialis.

18. **Efecto de la inhibición de los sistemas kallikreina kinina (SKK) y renina angiotensina (SRA) sobre la hiperfiltración de la preñez.** E. Oddo, J. Toledo, A. Scerbo, E. Arrizurieta.

Inst. Invest. Med. Alfredo Lanari. Riñón Exp. UBA.

El Enalapril (E) inhibe la hiperfiltración fisiológica de la preñez en ratas e induce un aumento de la excreción

de kallikreinas urinarias (KU) por el probable efecto simultáneo sobre el SRA y SKK. Para ratificar esta hipótesis se estudiaron los efectos individuales de un inhibidor del receptor de angiotensina II, Losartan (L) 25mg/kg/d y de la inhibición secuencial del SKK (Aprotinina, Apro 40.000 UIK/d i.p.) y SRA (Enalapril (E) 50 mg/kg/d vo) durante la preñez. No hubo diferencias significativas entre los animales tratados con E y L, observándose en cambio una abrupta caída en el período correspondiente al pico de hiperfiltración control, consecutiva a la administración sucesiva de Apro y E ($\text{CICr } 0.51''0.15$ vs $1.85''0.23$ $p < 0.05$). Se observó además un descenso de la KU ($97,61 \pm 8,54$ vs $23,04 \pm 10,09$) y un menor número de crías ($4,66 \pm 2,4$ vs $11 \pm 1,65$). La excreción de Na y K fue mayor con E y la Aldosterona de las ratas tratadas con E, L y Apro+E fue significativamente menor que en las controles ($161,15 \pm 28,45$; $795 \pm 201,7$ y $30,93 \pm 4,01$ vs 1910 ± 343 pg/ml). Estos resultados muestran que la integridad de la interrelación entre los SKK y SRA son necesarios para el mantenimiento de la hiperfiltración glomerular de la preñez.

19. **Ratas hiperoxalúricas (Hox). Efectos morfológicos y funcionales del enalapril (ENP).** M. Userpater, J. Toblli, M. Angerosa, C. Nyberg, P. Pagano, L. Romano, L. Ferder, F. Insera.

Laboratorio de Medicina Experimental, Hospital Alemán & Instituto de Investigaciones Biomédicas Universidad Hebrea Argentina Bar-Ilan. Buenos Aires.

Se evaluó el efecto del ENP (20 mg/l agua de beber) sobre la excreción urinaria de oxalatos y cambios histológicos en ratas Hox. por etilenglicol (1%). 24 Sprague-Dawley (250-300g). 4 grupos (G): G1) control, G2) Hox., G3) Hox+ENP, G4) ENP. Duración 4 semanas. Se obtuvo sangre y orina, y cortes de riñón se estudiaron con Bioscan - OPTIMAS 4.1. H&E, tricrómico y monoclonal anti α -SM actina. Resultados: Oxalato urinario (mg/g rata día): G1: $1,89 \pm 0,12$, G2: $11,8 \pm 0,79$, G3: $31,3 \pm 5,00$, y G4: $1,92 \pm 0,09$ ($p < 0,01$ G1 vs G2, G3; $p < 0,05$ G2 vs G3). Por morfometría: % área intersticial peritubular / área total: G1: $12,4 \pm 0,1$, G2: $22,1 \pm 0,3$, G3: $13,0 \pm 0,2$, y G4: $12,5 \pm 0,2$ ($p < 0,01$ G2 vs G1, G3, G4); % células con α -SM actina / células totales: G1: $0,2 \pm 0,1$, G2: $7,1 \pm 0,3$, G3: $0,8 \pm 0,3$, y G4: $0,2 \pm 0,1$ ($p < 0,01$ G2 vs G1, G3, G4; $p < 0,05$ G3 vs G1, G4). Resultados ($\bar{x} \pm \text{sem}$). Se utilizó ANOVA t Scheffe test. Solamente G2 presentó cambios hidrópicos de las células tubulares y cristales intratubulares oxalocálcicos. Conclusiones: Estos resultados sugieren que ENP protege del daño TI y la formación de cristales en la Hox. por etilenglicol, a pesar del aumento de la oxaluria.

20. **Polimorfismo inserción/delección (I/D) del gen de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) en la nefropatía diabética.** AR Fraga, SI García, PI Porto, CJ Pirola, RS Martín, E Arrizurieta.

Instituto de Investigaciones Medicas. Facultad de Medicina, UBA. Buenos Aires.

Estudios del polimorfismo I/D del gen de la ECA en distintas patologías sugieren que el alelo D, particularmente en homocigotas DD, podría estar asociado a proteinuria, nefropatía progresiva y sensibilidad a los inhibidores de la ECA (IEC). Tipificamos 7 pacientes diabéticos insulino dependientes, con un tiempo de evolución de 7 a 37 años en quienes se estudió expresión de proteínas, progresión de la nefropatía diabética (Cln vs tiempo) y flujo plasmático renal (CPAH). Ningún paciente era hipertenso, 4 presentaban proteinuria clínica y 3 microalbuminuria. La frecuencia genotípica fue de 3 DD y 4 ID. La evolución natural de la nefropatía diabética mostró ser no progresiva en 1 caso (ID), leve en 2 (ID y DD), moderada en 2 (ID y DD) severa en 2 (ID y DD). Los IEC tuvieron efecto favorable sobre la progresión en 3 DD y 1 ID y en la proteinuria sólo en 1 DD. En 4 pacientes (2 DD y 2 ID), el CPAH aumentó por acción de los IEC un 40 %. Con una muestra tan pequeña, sólo es posible sugerir que el alelo D (frecuencia en nuestra población diabético insulino dependiente del 71,5 %), confiere cierta susceptibilidad a sufrir los efectos deletéreos de la activación del sistema renina angiotensina.

- 21. Determinación de Heparan Sulfato (HS) urinario en pacientes diabéticos de ambos tipos.** Paglione AM, Elbert A, Bragagnolo JC, Bonavita CD, Mainetti H y Ruiz M.

Dto. de Bioquímica Clínica, Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA. Cátedra de Medicina Interna, División Dabetología, Facultad de Medicina, Hospital de Clínicas "José de San Martín".

Se describe una menor síntesis de HS en la membrana basal glomerular del diabético. No se conoce si ello se acompaña de mayor excreción urinaria. Determinamos HS en orina en 25 mujeres y 17 hombres diabéticos. Comparamos con 12 hombres y 12 mujeres controles sanos. Expresamos los resultados en mg / 24 horas. RESULTADOS: mujeres diabéticas $0,54 \pm 0,31$, hombres diabéticos $0,85 \pm 0,36$, controles: mujeres $0,28 \pm 0,17$, hombres $0,43 \pm 0,16$. Mujeres controles vs hombres controles $p < 0,025$, hombres diabéticos vs hombres controles $p < 0,001$, mujeres diabéticas vs mujeres controles $p < 0,001$. CONCLUSIONES: los hombres eliminan más HS que las mujeres. Los pacientes diabéticos eliminan más HS que los controles.

- 22. OPC-31260: Inhibición de la hormona antidiurética (HAD) en la insuficiencia renal crónica experimental (IRC).** RS Martin, C Bertuccio, J Toledo, EE Arrizurieta, FR Ibarra.

Inst Inv Mfjicas «A Lanari», Universidad de Buenos Aires.

Previamente demostramos que el sistema AMPc-adenilato ciclasa del asa gruesa medular ascendente de Henle está activado en la IRC Exp. La HAD estimula la producción de AMPc en ese segmento y se halla elevada en la IRC. Para evaluar un posible rol homeostático de la HAD en la IRC se ensayó un inhibidor no peptídico de la misma, OPC-31260(OPC) en dosis de 10 mg/kg

rata en forma intravenosa. La IRC se indujo por lesión térmica cortical superficial izquierda y posterior nefrectomía derecha. La administración de OPC aumentó el clearance de agua libre (CH_2O) a los 150 min tanto en controles (C) ($X \pm \text{ES}$) de $-22,36 \pm 4,32$ a $31,71 \pm 6,95$ ($P < 0,05$) como en IRC de $-15,97 \pm 6,72$ a $8,44 \pm 4,01$ ml/min ($P < 0,05$). El aumento fue mayor en IRC al expresarse como $\text{CH}_2\text{O}/\text{FG}$: $122,08 \pm 48,9$ IRC vs $67,57 \pm 4,43$ C. Las excreciones de Na^+ ($\text{UNa}^+ \cdot \text{V}$) y osmolar ($\text{Uosm} \cdot \text{V}$) no variaron en ambos grupos durante el efecto acuareético, pero aumentaron a los 270 min sólo en IRC (de $2,09 \pm 1,05$ a $4,83 \pm 2,22$ $\mu\text{Eq}/\text{min}$ y de $11,33 \pm 3,91$ a $22,70 \pm 3,30$ $\mu\text{Osm}/\text{min}$, respec.) El clearance de inulina no varió tanto en C como en IRC. El OPC al promover una mayor excreción de agua y sodio en la IRC, sugiere que la HAD juega un rol adaptativo en el balance hidroelectrolítico y que este efecto no modifica el filtrado glomerular.

TUMORES I

- 23. Alteraciones morfológicas inducidas por progestágenos y EGF en mamas de hembras BALB/c.** S Vanzulli, P Pazos, C Lanari, A Molinolo.

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires.

Objetivo: Caracterizar las lesiones morfológicas mamarias inducidas por acetato de medroxiprogesterona (MPA) y/o progesterona (Pg) y analizar la contribución de EGF en las alteraciones por MPA. Hembras vírgenes BALB/c, 10 por grupo, recibieron pellets de 40mg de MPA o Pg, espaciados por un año: MPA + MPA (1), MPA + Pg (2), Pg + MPA (3) o Pg + Pg (4). Ratones sialoadenectomizados (sx) se trataron con MPA ($n=5$, 40mg sc), MPA + EGF ($n=3$, 5 μg sc/36 hs durante 45 días). Se estudiaron las mamas con la técnica de montaje total, luego de los 6 meses del último pellet (hormona combinadas) y a los 45 días (EGF). Se observaron lesiones lobulillares (LL) focales y difusas, caracterizadas por hiperplasia con distensión y proliferación ductular y acinar, y lesiones ductales (LD), proliferaciones epiteliales en forma de brotes paraductales y distorsión de la arquitectura con ramificación y ensanchamiento ductal irregular. Las LD predominaron en los grupos 1 y 2 y fueron menos evidentes en el 3. Los CL con distribución difusa dominaron en el grupo 4 y en menor grado en el grupo 2. Los cambios lobulillares, típicos de la Pg, fueron reversibles, mientras que se observó persistencia de las alteraciones ductales inducidas por MPA; esto sugiere la existencia de un efecto independiente de su acción progestacional. La morfología de las lesiones lobulillares focales es compatible con las descriptas en animales infectados con MMTV. El tratamiento con EGF revirtió la hipoplasia mamaria observada en los ratones sx tratados con MPA. Estos resultados apoyan la participación del EGF endocrino en la hiperplasia mamaria inducida por MPA.

24 Efecto de bFGF en un adenocarcinoma mamario murino dependiente de progestágenos (PD). M Simian, C Lamb, A Molinolo, C Lanari.

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires.

El acetato de medroxiprogesterona (MPA) 10nM estimula el crecimiento de tumores PD *in vitro*, efecto que puede ser limitado por factores séricos. El objetivo fue demostrar que la estimulación sérica involucra la vía del receptor de progesterona (RP) e investigar si este efecto podría estar mediado por bFGF. Se sembraron células tumorales de cultivos primarios en presencia de 5% SFB de complementado (dec) y adsorbido con carbón (ch). Se evaluó proliferación celular por incorporación de timidina tritiada a las 48 hs de incubación con soluciones problema. Los ensayos con soluciones problema se efectuaron por octuplicado. El agregado de bFGF (10-100ng/ml) a F12/HAM + 1% SFB dec ch (C) estimuló el crecimiento (Ej. en cpm: bFGF 100 ng/ml: 9070 + 2776, vs C: 4052 ± 1097, $p < 0,001$). Con MPA 10nM se observó un efecto aditivo (MPA: 8940 ± 2863, MPA + bFGF: 15136 ± 2835, $p < 0,05$); 10nM RU486 sólo revirtió la estimulación inducida con MPA (RU486 + MPA: 3325 ± 1129, RU486 + FGF: 6176 ± 2162; RU486 + MPA + bFGF: 7910 ± 1956). En experimentos donde se obtuvo estimulación usando 5 vs 1% SFB dec ch (1139 ± 339 vs 382 ± 97, $p < 0,01$), el efecto fue revertido ($p < 0,05$) por RU486 (5% SFB dec ch + RU486: 611 ± 152). El bFGF tiene un efecto estimulador independiente del RP mientras que los factores séricos utilizarían vías que lo involucran.

25. Sitios de unión al MPA de adenocarcinomas mamarios ductales murinos inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA). MF Montecchia, I Luthy, G Piroli, EH Charreau, C Lanari.

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires.

Objetivo: caracterizar los sitios de unión específicos de MPA en tumores dependientes de progestágenos, con alto contenido de receptores de progesterona (RP), teniendo en cuenta que MPA posee actividad androgénica y glucocorticoide. Se analizó la presencia de receptores de glucocorticoides (RG), andrógenos (RA) y RP con técnicas de saturación a punto único, usando dexametasona, dihidrotestosterona (DHT) o R1881 y R5020 tritiados, respectivamente. Se estudió la capacidad de R5020, R1881 y cortisol (F) de desplazar la unión específica de ^3H -MPA. Se analizó la unión de ^3H -MPA por análisis de Scatchard, punto único a saturación y curvas de desplazamiento. El desplazamiento de ^3H -MPA con MPA o R5020 fríos (Scatchard) no fue diferente (MPA: Kd: 16,9 nM, Q: 224 fmol/mg prot; R5020: Kd: 16 nM, Q: 282 fmol/mg prot). Se evaluó la especificidad de unión con curvas de desplazamiento de ^3H -R5020 competido con R5020, MPA, RU486, E2, P y DHT (R5020, Pg, RU486 > MPA >> DHT > E2). Con ^3H -R1881 (en presencia de 1000X triamcinolona) o ^3H -R5020, ambas hormo-

nas frías desplazan equivalentemente en los dos sistemas. Resultados similares se obtuvieron en otros tumores y en úteros de ratón. Se usó ^3H -DHT para verificar la existencia de receptores de andrógenos (RA); no se observó unión específica. No se encontraron RG en los tumores estudiados. Los resultados sugieren que MPA se une específicamente al RP. El hecho de que en útero se observe el mismo patrón de competencia indica que este resultado anómalo con R1881 no es propio de estos tumores sino un fenómeno del ratón.

26. Regulación por tamoxifeno del crecimiento tumoral y de la expresión de receptores hormonales en un modelo de adenocarcinomas mamarios murinos inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA). MF Montecchia, P Pazos, C Lanari.

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires.

Objetivos: estudiar los efectos de tamoxifeno (TAM) y estrógenos sobre el crecimiento tumoral y sobre la expresión de receptores de estrógeno (RE) y de progesterona (RP). Se usaron líneas tumorales *in vivo* de crecimiento autónomo, que expresan RE y RP y regresionan con tratamiento estrogénico, que se transplantaron a hembras BALB/c. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mm² se trataron según el siguiente esquema: 1) control, 2) 17- β -estradiol (E2), pellets sc de 5 mg, 3) TAM: pellets sc de 5 mg. Se midió el crecimiento tumoral durante dos meses y se evaluaron receptores por punto único a saturación en animales sacrificados a la semana de comenzado el tratamiento, para obtener material de tumores en regresión. E₂ induce regresión del crecimiento tumoral respecto al control ($p < 0,001$) y TAM no lo modifica. Los valores de RE y RP expresados en fmol/mg proteína (mediana-rango) fueron: 1) control: RE= 20 (10-52) (n=14), RP= 21 (0-114) (n=14); 2) E₂: RE= 17 (0-77) (n=21), RP= 63 (0-700) (n=26); 3) Tam: RE= 14 (0-22) (n=6), RP= 236 (63-442) (n=6). TAM estimuló la significativamente la expresión de RP con respecto al control ($p < 0,01$) y a E₂ ($p < 0,05$). Tanto TAM como E₂ inducen la expresión de RP, sin embargo TAM no inhibe el crecimiento tumoral. Estos resultados sugieren que el efecto agonista estrogénico de TAM es incompleto; se hipotetiza que o bien el incremento de RP no se encuentra implicado en la regresión del crecimiento tumoral en este sistema, o bien existen subpoblaciones de RP que son diferencialmente reguladas por E₂ y TAM.

27. Respuesta inmune humoral en ratones tratados con metilnitrosurea (MNU) y acetato de medroxiprogesterona (MPA). Relación con carcinogénesis. P Pazos, R Gamberale, C Lanari, M Isturiz, M Giordano.

Instituto de Biología y Medicina Experimental y Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.

Objetivos: investigar la presencia de un posible efecto inmunosupresor de MPA que favorezca la carcinogénesis mamaria por MNU y MPA. Se evaluó la res-

puesta a inmunizaciones con glóbulos rojos de carnero (GRC), valorando título de anticuerpos (TA) en las respuestas primaria (RP) y secundaria (RS). Se efectuaron hemaglutinaciones a los 7, 30 y 90 días post-tratamiento con MNU (50mg/kg ip), MPA (depot, 40mg sc), MNU + MPA en hembras vírgenes BALB/c (12xgrupo). En el grupo tratado con MNU se observó una disminución del TA con respecto del control ($p < 0,05$), MPA indujo un aumento ($p < 0,01$) y logró revertir la depresión inducida por MNU (Ej. Representativo: RP 90 días: control: 400 ± 25 , MNU: 40 ± 5 , MPA: 800 ± 200 , MNU + MPA: 650 ± 45). El efecto estimulador del MPA se debe a su actividad hormonal pues es revertido por onapristona (onap) 10 mg/kg/día (Ej: RP 7 días: MPA: 1300 ± 600 , MPA + onap: 600 ± 60 , $p < 0,05$). El tratamiento con MNU induce una alta incidencia de leucemias (65%), que se reduce (22%), $p < 0,05$, con tratamiento con MPA. Nuestros resultados no apoyan la existencia de un efecto inmunosupresor de MPA que contribuya a la carcinogénesis mamaria en este modelo, por el contrario, MPA induce una marcada inmunoestimulación humoral, cuya evidencia biológica podría ser el efecto protector de la leucemogénesis.

28. Valor pronóstico de dos expresiones funcionales del receptor a estradiol en cáncer de mama. E. Levin, A. Actis, V. Dorfman, S. Caruso, RW Levin.

Dept Bioquímica Humana-Fac Medicina-UBA

Hemos evaluado la predicción pronóstica en neoplasias mamarias RE+, de 2 expresiones funcionales del RE: contenido de receptor a progesterona (RPg) y prueba de Desplazamiento con tamoxifen (T). En 92 pacientes operadas entre 1987-91, se registró la sobrevida según estadios, como indicador de evolución y su correlación con los dos índices funcionales. La prueba de Desplazamiento permite clasificar los tumores RE+ en Desplazables (D) y Poco Desplazables (PD), según la potencia del T para inhibir la unión E2-RE. Para datos globales, la sobrevida de los pacientes fue de $5,6 \pm 0,3$ años para los RE+D y de $3,3 \pm 0,3$ para los RE+PD ($p < 0,001$). También se cumple para cada estadio tumoral. El contenido de RE entre el grupo D y PD no fué significativamente diferente. No hubo diferencias significativas de sobrevida entre tumores RPg+ y RPg-. Se concluye: a) Ambos indicadores son variables independientes, de diferentes dominios funcionales del RE. b) Pacientes con tumores RE+ D, aún siendo RPg- tienen mejor pronóstico y evolución más favorable. c) Pacientes con tumores RE+ D responden mejor a los tratamientos con T, aunque no expresen RPg.

29. Cronocirugía: Tumorectomía de día o de noche y a distintos momentos del ciclo sexual. Su relación con la sobrevida y evolución del adenocarcinoma mamario murino M3. LL Colombo. Area Investigaciones.

Inst. de Oncología Angel H. Roffo (Universidad de Buenos Aires).

Introducción: El ritmo día/noche, actividad/reposo, tiene importantes influencias sobre el sistema endócrino, inmune, metabolismo de órganos y tejidos normales y tumorales. Todos los pacientes quirúrgicos (oncológicos o no) son operados solamente de día. Las cirugías nocturnas solo están reservadas para las urgencias de guardia. Algunos autores opinan que el momento del ciclo sexual en el cual se operan los tumores mamarios influiría en la sobrevida. El propósito de este trabajo es analizar en un modelo experimental murino, si el momento del día (24hs) y/o del estadio sexual en el cual se realiza la extirpación de un tumor primario, podría influir en la sobrevida y evolución del animal operado. **Métodos:** 156 ratones totales (91 hembras y 65 machos) todos F-1 (71 C57BLxBalb/c y 85 CBA/CAJxBalb/c), portadores del adenocarcinoma mamario murino M3 (de origen Balb/c), subcutáneo, de 10-14mm de diámetro, fueron sometidos a cirugía de su tumor primario. La mitad de ellos entre las 11 y 15 hs (día) y la otra mitad entre las 23 y 03 hs (noche), (en el tercio medio del período de luz y oscuridad respectivamente) siendo el período de luz de 07 a 19 hs. En las hembras se determinó el estadio del ciclo sexual, por colpocitología exfoliativa al momento de la cirugía. Debido a que Balb/c (la cepa original del tumor M3) es una cepa con débil pico nocturno de Melatonina, es que se utilizaron híbridos F-1 de Balb/c con 2 cepas de marcado cambio nocturno de Melatonina, como C57BL y CBA/CAJ. Previamente se demostró que el comportamiento biológico del tumor M3 era similar en ambos F-1 que en la cepa Balb/c, y que dicho tumor crece y metastatiza sin dificultad en ratones machos. **Resultados:** Las curvas de sobrevida no difirieron significativamente entre los diferentes grupos. El % de ratones con recidiva, la incidencia y número de metástasis tampoco difirió entre los grupos. **Conclusiones:** En este modelo y en estos tiempos horarios y a estos tamaños, el operar de día o de noche, o en distintas fases del ciclo sexual femenino, no modificó la evolución post quirúrgica de los ratones F-1.

30. Desnervación del ganglio regional sin desnervación del territorio drenado: Influencia sobre las metástasis ganglionares de los adenocarcinomas mamarios murinos M3 y MM3. LL Colombo, RP Meiss, RJ Rodriguez.

Area Investigaciones y Serv. Cirugía Oncológica Inst. de Oncología A.H. Roffo (UBA) y CEO. Fund. Maissa. Acad. Nac. Med. Buenos Aires.

El crecimiento de las metástasis depende fundamentalmente de factores de la célula tumoral (semilla) y del órgano a ser metastatizado (suelo). La desnervación de la piel u otro órgano puede provocar alteraciones en el crecimiento, tanto del órgano normal como de las células tumorales que se encuentren dentro de él. La desnervación (parasimpática) de un ganglio linfático, provoca cambios en él, como una disminución de la actividad de linfocitos supresores, un aumento de las células formadoras de anticuerpos, etc. El objetivo fue investigar si los cambios producidos en el microambiente

de un ganglio linfático, debidos a la deservación del mismo, favorecerían o perjudicarían el crecimiento de las metastasis en su interior. **Métodos:** 36 Ratones machos Balb/c a los que 1 mes antes se les realizó la deservación del ganglio linfático popliteo izq sin deservar el territorio drenado, con técnica de microcirugía, bajo microscopio estereoscópico (n:17), o una falsa operación (n:19), fueron inoculados en la almohadilla plantar izq. con 5×10^5 cels M3 (n:22) o 10^6 cels MM3 (n:14) en 0.05 ml. Se midió la latencia y velocidad de crecimiento. Luego de alcanzar 1-1,5 gr de masa tumoral (a los 28 días para M3 y 35 días para MM3), los ratones se sacrificaron, los tumores y ganglios drenantes y contralaterales pesados. Los ganglios popliteos fueron procesados con técnicas de histopatología convencional y analizados en cortes seriados para detectar la presencia de metastasis en su interior. **Resultados:** ganglios con metastasis / totales: M3: Desnerv.: 3/10 sham: 6/12 (ns). MM3: Desnerv.: 0/7, Sham: 1/7 (ns). No se encontraron diferencias en latencia, velocidad de crecimiento, tamaño tumoral al sacrificio, ni metastasis pulmonares, entre desnervados y controles, tanto en M3 como MM3. **Conclusión:** La deservación exclusivamente ganglionar, no afectó la incidencia ni el crecimiento de las metastasis ganglionares popliteas en el modelo tumoral mamario murino M3/MM3 creciendo en la almohadilla plantar, ni ninguno de los demás parametros analizados.

31. Aumento de la colonización pulmonar por células metastásicas de carcinoma mamario murino mediante la inhibición de la fibrinólisis sistémica. DF Alonso, GE Bertolesi, EF Farías, DE Gomez, E Bal de Kier Joffé.

Laboratorio de Oncología Molecular, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes y Area Investigación, Instituto de Oncología Angel H. Roffo, Universidad de Buenos Aires.

La formación de fibrina protegería a las células metastásicas, pero no se conoce con exactitud el papel del sistema fibrinolítico circulante en la remoción de microémbolos tumorales. Se estudió el efecto de la carboxamidina B623, un potente inhibidor sintético de la enzima profibrinolítica uroquinasa ($IC_{50} = 0,07$ mM), y el anticoagulante heparina (PTTK= 210 UI/mg) sobre la colonización metastásica en pulmón y la agregación in vitro de células F3II de carcinoma mamario. B623 se administró por vía i.p. en ratones BALB/c (7,5 mg/kg/día) durante 5 días, comenzando el día antes de la inoculación i.v. de 2×10^5 células F3II. La heparina se administró i.p. al momento de la inoculación tumoral (12 mg/kg). La fibrinólisis se cuantificó por caseinólisis radial en euglobulinas plasmáticas. El tratamiento con B623 redujo la actividad de la fibrinólisis circulante y aumentó el número de metastasis pulmonares (Control: Md 17, rango 5-26 vs B623: 40, 14->50; $p < 0,02$). B623 revirtió la acción antimetastásica de la heparina en el presente modelo (Heparina: 6, 4-11 vs Heparina+B623: 30, 6-39; $p < 0,01$). Mediante videomicroscopía se determinó que B623 (1-5 mM) induce in vitro la formación de agre-

gados de células F3II (5×10^5 células/ml MEM) en presencia de plasma de ratón (1:40) y facilita el atrapamiento celular en geles de fibrina. El bloqueo de la fibrinólisis sistémica mediante un inhibidor selectivo de uroquinasa favorecería los pasos iniciales de la colonización en pulmón de células metastásicas F3II.

32. Regulación de la síntesis y liberación de histamina en un carcinoma mamario en ratas. G. Cricco, N. Engel, G. Martín, C. Davio, M. Croci, R. Bergoc, E. Rivera.

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

Previamente demostramos que en carcinomas experimentales la histamina (Hi) regula el crecimiento a través de receptores H1 y H2 de membrana. En este trabajo se estudió la acción de la fluorometilhistidina (MFMH), inhibidor de la enzima histidina decarboxilasa (HDC) y la regulación de la expresión de ARNm de HDC por Hi. Empleando un RIA para Hi se determinó que la MFMH 10^{-4} M no produce depleción de Hi en los tumores pero sí aumento de su liberación. En cultivos primarios de estas células en agar blando la MFMH produjo un 50% de inhibición de la proliferación con CE50 de 70 nM, que se correlacionó con el incremento de la Hi en el medio extracelular. El tratamiento *in vivo* de ratas con MFMH (50 mg/kg/día), produjo un 80% de regresión tumoral con marcado aumento de la Hi plasmática ($0,8 \pm 0,4$ μ M a 4 ± 1 μ M) en la primer semana. En cortes de tejido tumoral, la expresión de ARNm de HDC fue estimulada *in vitro* por acción de Hi a bajas concentraciones o por agonistas H2 e inhibida por Hi en altas dosis o agonistas H1. Estos datos indican que la MFMH inhibe el crecimiento tumoral no por depleción de la Hi endógena sino por un incremento en su liberación y corroboran la hipótesis de que la Hi endógena actúa como factor autocrino de crecimiento regulando su propia síntesis y liberación a través de receptores de membrana.

33. Modificaciones farmacológicas de receptores a estrógenos (RE) y a progesterona (RP) en útero de ratones. A Actis, V Dorfman, S Caruso, E Levin

Fac. Medicina - Universidad de Buenos Aires

El tráfico núcleo $\rightarrow$ citoplasma de los receptores esteroideos es uno de los mecanismos regulatorios de su función transcripcional y puede reflejarse en su distribución subcelular. El objetivo fue estudiar el efecto de distintos fármacos utilizados en tratamientos de cáncer de mama: Tamoxifen (T), Medroxi-progesterona (MPA) y 8-Cl-AMPc (8-Cl), análogo del AMPc, sobre: 1) la expresión cuantitativa y la distribución subcelular de RE y RP en útero de ratones, 2) diferencias en las isoformas de RE. El T sólo o combinado con MPA u 8-Cl inhibe la expresión total de RE (control: 328 ± 27 vs 104 ± 45 fm/mg prot. $p < 0,01$) aumentando su retención nuclear. MPA y 8-Cl no producen modificaciones significativas. Por

otro lado, T estimula la expresión de RP (743 ± 39 vs 1184 ± 120) y favorece su retención nuclear. MPA inhibe la expresión total (743 ± 39 vs 267 ± 40) y 8-Cl no afecta el contenido, pero aumenta la retención nuclear. La combinación MPA+T restituye el nivel total de RP a valores similares a los controles y con 8-Cl+T, no se observa estímulo de la síntesis de RP. En los perfiles de isoformas de RE por HPLC, MPA produce aumento significativo en la proporción de la forma oligomérica de mayor PM, igual que con 8-Cl+T. El contenido de RE y RP, su distribución subcelular y el perfil de isoformas de RE pueden ser afectados por drogas dirigidas a otras vías transcripcionales.

34. Producción de timomas en ratones AKR por virus polioma. N Sanjuan, J Otero, S Perazzo, MP Costa.

Dept. Microbiología. Fac. Medicina (UBA).

El objeto de este trabajo fue estudiar la relación entre la replicación viral y la tumorigénesis por Polioma-virus. Se inocularon ratones AKR neonatos con 105 UFP de Polioma PTA,0 con sobrenadante de cultivos celulares no infectados. De los ratones, 12/12 desarrollaron timomas a los 60 días; no se detectaron neoplasias en los controles (0/8). Ultraestructuralmente eran epitelomas pobremente diferenciados, con abundantes polisomas y escaso desarrollo de desmosomas y aparatos de Golgi. La presencia de virus infectivos intratumorales fue detectada por cultivo en células NIH3T3. La inmunomarcación de cortes histológicos demostró la presencia de antígenos virales tardíos en 1 de cada 5 células tumorales. No obstante, en extensas áreas de tumores con inmunomarcación positiva, no se observaron por microscopía electrónica partículas virales intracelulares. Se concluye que la expresión de antígenos estructurales (tardíos) de virus Polioma en células tumorales, no implicaría necesariamente el ensamblaje de viriones en estas células.

GASTROENTEROLOGIA I

35. Capacidad funcional hepática en ratas con estenosis coledociana (EC). A Farroni, R Trbojevič, G Pisani, GP Rodríguez, EA Rodríguez, EA Rodríguez Garay.

IFISE, CONICET, Universidad Nacional de Rosario.

En un trabajo previo se desarrolló un modelo de EC poco marcada en un intento de reproducir experimentalmente dicha patología de difícil predicción. Se estudiaron 7 ratas con EC y 5 sometidas a una operación simulada (S) efectuándose los estudios a los 7-8 días. Se recogió bilis basal (10 min) y se inició la infusión continua i.v. de taurocolato de sodio (TC) ($2,21 \mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{ g p.c.}$). Se recogió bilis durante 6 periodos de 10 min, siendo los animales sacrificados por punción cardíaca y los hígados pesados. Se extrajo tejido hepático para estudios histológicos. Se determinó flujo biliar (FB) y las excreciones de ácidos biliares (AB), fosfatasa alcalina (FA) y g-glutamyl transpeptidasa (GGT). En el

grupo EC se encontró dilatación marcada de colédoco, aumento de número de conductos en áreas portales (EC: $3,17 \pm 0,46$; S: $1,45 \pm 0,03$, $p < 0,05$) y de fracción de volumen espacio porta (EC: $0,048 \pm 0,003$; S: $0,029 \pm 0,001$, $p < 0,05$). FB disminuyó en S a partir de 30 min, manteniéndose elevado en EC a los 50 y 60 min ($p < 0,05$). Existió elevada correlación positiva entre FB y AB en ambos grupos (EC: $r=0,95$, $y=0,9629 \pm 0,0198.x$; S: $r=0,94$, $y=0,6087 \pm 0,0190.x$). FA estuvo correlacionada positivamente con AB en ambos grupos: EC: $r=0,599$, $p < 0,01$, $y=-0,0421 \pm 0,0016.x$; S: $r=0,617$, $p < 0,01$, $y=-0,0865 \pm 0,0032.x$. La excreción acumulativa de FA (mU/g híg.) estuvo significativamente disminuida en EC con respecto a S a los 30, 40, 50 y 60 min ($0,68 \pm 0,11$ vs $1,37 \pm 0,26$, $0,86 \pm 0,13$ vs $1,70 \pm 0,32$, $1,00 \pm 0,14$ vs $1,88 \pm 0,36$ y $1,09 \pm 0,14$ vs $2,02 \pm 0,38$ ($p < 0,05$). La excreción de GGT mostró similares tendencias pero no existieron diferencias significativas entre grupos. Los resultados sugieren en EC una mayor capacidad de generación de FB y de resistencia a la acción solubilizadora de TC sobre la ectoenzima canalicular FA.

36. Hepatotoxicidad inducida por colchicina: rol de las sales biliares. FA Crocenzi, A Sisti y MG Roma

IFISE-CONICET. Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, UN Rosario.

Introducción: En estudios previos demostramos que ratas pretratadas con el agente desorganizador de microtúbulos colchicina presentan una alta susceptibilidad al efecto hepatotóxico inducido por sobrecarga de sales biliares detergentes, alterando vías vesiculares de reparación de membranas dependientes de microtúbulos. Nos propusimos averiguar si este efecto es visible a velocidades basales de excreción de sales biliares y si puede modificarse por manipulaciones del pool de sales biliares endógenas. **Métodos:** La hepatotoxicidad se determinó por la liberación a sangre y bilis de LDH y aminotransferasas. La concentración total y composición de sales biliares en bilis se determinó por HPLC. **Resultados:** La hepatotoxicidad inducida por colchicina ($0,025-1 \mu\text{mol}/100 \text{ g p.c.}$, i.v., 1 h) mostró una curva sigmoidea en función del log de la dosis (incremento máximo de excreción biliar de LDH: $950 \pm 124\%$), compatible con una interacción específica ligando (colchicina)-receptor (microtúbulos). El análogo inactivo lumi-colchicina no produjo efecto. La descarga biliar máxima de LDH se redujo a $216 \pm 29\%$ ($p < 0,001$) por drenaje biliar de 8 hs conducente a una reducción de la excreción de sales biliares de $83 \pm 2\%$. Esta descarga disminuyó aún más luego de la repleción con las sales biliares no hepatotóxicas taurodehidrocolato y taurooursodesoxicolato ($100 \pm 13\%$ y $157 \pm 39\%$, respectivamente). Los cambios de LDH y aminotransferasas en plasma siguieron un patrón similar al de la LDH en bilis. **Conclusión:** La hepatotoxicidad por colchicina depende de la magnitud y composición de las sales biliares que atraviesan el hígado. El hecho que este daño sea ya visible a niveles basales de excreción biliar indica que los mecanismos vesiculares involucrados en la reparación de membranas

protegen al hepatocito del daño por sales biliares durante la formación normal de la bilis.

- 37. Ácido ursodesoxicólico (UDCA) inhibe conjugación hepática de etinilestradiol (EE): implicancias en prevención de colestasis inducida por estrógenos.** EJ Sánchez Pozzi, AD Mottino, MG Roma, VA Catania, MG Luquita, JM Pellegrino, FA Crocenzi, EA Rodríguez Garay.

IFISE-CONICET. Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario.

Introducción: En la rata, la administración de UDCA mejora la colestasis intrahepática inducida por EE vía un mecanismo no aclarado. Un metabolito del EE, el 17 β -glucurónido, es colestático y posible mediador de sus efectos. Este trabajo evalúa el efecto de la administración de UDCA sobre la 17 β -glucuronización del EE, en ratas tratadas con este estrógeno. **Métodos:** Se utilizaron 5 grupos de ratas machos (n=6-10). Cuatro grupos recibieron EE (5 mg/kg peso/día por 5 días s.c.) y de estos, 3 recibieron dosis crecientes de UDCA (15,25 y 50 mg/kg peso/día por 5 días, i.p., U15, U25, U50, respectivamente) y el restante, propilenglicol (grupo EE). El quinto grupo recibió sólo los vehículos (C). El sexto día se recogió bilis, se sacrificaron los animales y se determinó in vitro la glucuronización de EE. **Resultados** (expresados como promedio $\pm$ DE): EE disminuyó significativamente ($p<0,05$) el flujo biliar (0.98 $\pm$ 0.23 μ l/min/g hígado) con respecto a C (1.92 $\pm$ 0.29) y esta disminución fue revertida parcialmente por UDCA (U15: 1.26 $\pm$ 0.27; U25: 1.34 $\pm$ 0.22; U50: 1.31 $\pm$ 0.35), siendo sólo las últimas dos dosis significativamente diferentes de EE ($p<0,05$). Paralelamente, EE incrementó su propia 17 β -glucuronización (55 $\pm$ 8 pmol/min/mg proteína; C: 42 $\pm$ 11, $p<0,05$) mientras que UDCA revirtió este aumento (U15: 48 $\pm$ 3; U25: 42 $\pm$ 8; U50: 45 $\pm$ 5) (U25 y U50 significativamente diferentes de EE, $p<0,05$). **Conclusiones:** La disminución de la glucuronización in vitro de EE producida por UDCA sugiere que parte del efecto beneficioso de la sal biliar podría estar mediado por una menor formación in vivo del agente colestático EE 17 β -glucurónido.

- 38. Cambio de roles de dos isoformas de la sintasa del óxido nítrico en dos modelos experimentales de hipertensión portal.** A Gadano, P Sogni, S Yang, D Lebrec.

INSERM U-24, Hôpital Beaujon, Clichy, Francia.

La hiperproducción de óxido nítrico (NO) juega un rol mayor en la vasodilatación asociada a la hipertensión portal (HTP). Los roles relativos de las isoformas de la sintasa del óxido nítrico (NOs) no han sido establecidos y pueden diferir en distintos modelos de HTP y en distintos momentos de la evolución del modelo. Este estudio evaluó la contribución relativa de las NOs constitutiva (cNOs) e inducible (iNOs) en la hiperproducción de NO en dos modelos de HTP en ratas. La vasoconstricción a la noradrenalina (NA 10 $^{-6}$ M) y la vasodilatación a la acetilcolina (ACh 10 $^{-7}$ a 10 $^{-4}$ M) fueron estudiadas en ani-

llos aislados de aortas de ratas control (C), con operación ficticia (OF), estenosis de la vena porta (EVP) o ligadura y sección del colédoco (LSC) en los días 1, 4, 7, 14 y 28 post-cirugía. Los estudios se realizaron: a) en condiciones basales; b) tras pre-incubación con un inhibidor de la NOS, (L-NNA 3 $\times$ 10 $^{-5}$ M), o con un inhibidor de la cNOs (W7 10 $^{-5}$ M), o con un inhibidor de la iNOs (aminoguanidina, AG 3 $\times$ 10 $^{-4}$ M). Los nitratos plasmáticos fueron medidos. Respuestas disminuidas a NA observadas en OF, EVP y LSC en días 1 y 4, comparadas con C, fueron revertidas por L-NNA o AG pero no por W7. En día 7, las respuestas a la NA de OF fueron similares a las de C. Por el contrario, las ratas EVP y LSC permanecieron hiporeactivas en días 7, 14 y 28, comparadas con OF. En EVP, la hiporeactividad fue corregida con L-NNA (d14: 1,75 $\pm$ 0,11 a 2,51 $\pm$ 0,09g, $p<0,01$) o W7 (d14: 1,82 $\pm$ 0,09 a 2,37 $\pm$ 0,10g, $p<0,01$) pero no con AG. En LSC, la hiporeactividad fue corregida con L-NNA (d28: 1,91 $\pm$ 0,11 a 2,53 $\pm$ 0,12g, $p<0,01$) o W7 (d28: 1,89 $\pm$ 0,09 a 2,44 $\pm$ 0,09g, $p<0,01$) mientras que la modificación fue parcial con AG. Los nitratos aumentaron en el día 1 en los 3 grupos, disminuyeron en el día 7 y reaumentaron en los días 14 y 28 en EVP y LSC, respectivamente. Este estudio demuestra que, en dos modelos experimentales de HTP, existe una hiperproducción precoz de NO, probablemente vinculada a la inducción post-quirúrgica de la NOS. Por el contrario, una vez que el síndrome de HTP se ha desarrollado en forma completa, es la isoforma constitutiva de la NOS la que juega el rol principal.

- 39. Efecto de la inhibición de la síntesis de óxido nítrico (ON) sobre el tiempo de sangría (TS) en un modelo experimental de cirrosis hepática (CH).** L Albornoz, JC Bandi, O Galdame, S Geron, R Mastai.

Sección de Hígado, Servicio de Clínica Médica, Hospital Italiano, Buenos Aires.

El ON, potente vasodilatador endógeno, ejerce un papel importante en la función plaquetaria, inhibiendo la adhesividad y agregación de las plaquetas. El presente estudio fue dirigido a evaluar el papel del ON en la fisiopatología de los trastornos de la hemostasia primaria en ratas con CH inducida mediante ligadura y sección del colédoco. Se determinaron TS y presión arterial media (PAM), en condiciones basales y a los 5, 15 y 30min tras la administración de Nw-nitro-L-arginina (L-NNA, 5mg/kg, ev) o su vehículo. Las ratas cirróticas mostraron un TS mas prolongado (168 $\pm$ 38seg) y una menor PAM (116 $\pm$ 4 mmHg) en comparación con el grupo control (105 $\pm$ 25 seg, 133 $\pm$ 6 mmHg, $p<0,01$). La administración de L-NNA ocasionó en las ratas cirróticas una disminución del TS que fue máxima a los 15min (vehículo: 180 $\pm$ 33vs L-NNA: 103 $\pm$ 21 seg, $p<0,01$) y una elevación de la PAM (vehículo: 116 $\pm$ 6 vs L-NNA: 141 $\pm$ 11 mmHg, $p<0,01$). Los efectos de la L-NNA fueron abolidos mediante la administración previa de L-arginina (300mg/kg). En el grupo control no se observaron cambios significativos del TS y PAM luego del vehículo o L-NNA. Nuestros resultados muestran que la inhibición de

la síntesis de ON normaliza el TS prolongado en animales con CH. Estos datos sugieren que el ON puede jugar un papel importante en la fisiopatología de los trastornos de la hemostasia primaria que se observan en la CH.

40. Beneficio hemodinámico de la administración de naftazona en ratas con hipertensión portal.
A Gadano, P Sogni, S Yang, D Lebrech.

INSERM U-24, Hôpital Beaujon, Clichy, Francia.

La hiperproducción de óxido nítrico (NO) juega un rol mayor en la vasodilatación asociada a la hipertensión portal (HTP). La inhibición de la producción de NO debería entonces corregir la alteración en el tono vascular. Estudios realizados en anillos aislados de aorta, mostraron que la naftazona inhibe la producción de NO; esta sustancia podría entonces ser útil en el tratamiento de la HTP. Hemodinámicas sistémica y esplácnica fueron evaluadas antes y 10 min después de la administración IV de 432 µg/Kg de naftazona o tras 4 días de administración oral de 10 mg/Kg día de naftazona, en dos modelos de HTP en ratas. Los estudios agudos fueron realizados en 8 ratas normales, en 8 ratas con estenosis de la vena porta (EVP) y en 8 ratas cirróticas. La administración crónica en 8 ratas con EVP fue comparada a la de L-NAME, un inhibidor conocido de la producción de NO. La administración aguda de naftazona redujo significativamente la presión portal en ratas con EVP ($13,0 \pm 0,4$ a $10,1 \pm 0,6$ mmHg) o cirrosis ($12,4 \pm 0,7$ a $10,4 \pm 0,7$ mmHg). Esto se asoció a una disminución en la resistencia intrahepática y de la circulación colateral. La administración crónica de naftazona redujo significativamente la presión portal, comparada a placebo ($15,1 \pm 0,5$ a $13,7 \pm 0,4$ mmHg). Este efecto dependió de una reducción significativa del flujo sanguíneo portal ($7,4 \pm 0,6$ a $4,4 \pm 0,6$ ml/min/100g). L-NAME redujo significativamente el gasto cardíaco y el flujo sanguíneo portal pero no la presión portal. Estos resultados muestran que en ratas con HTP, la administración aguda o crónica de naftazona disminuye la presión portal por mecanismos que parecen ser diferentes. Estudios clínicos son necesarios para demostrar un efecto beneficioso de la naftazona en pacientes con HTP.

41. Efecto natriurético de la asociación de la terlipresina y el factor atrial natriurético en pacientes con cirrosis y ascitis refractaria.

A Gadano, R Moreau, D Valla, D Lebrech. *INSERM U-24, Service d'Hépatologie, Hôpital Beaujon, Clichy, Francia.*

La ausencia de una respuesta renal a la administración del factor atrial natriurético (FAN) en pacientes con cirrosis y ascitis refractaria ha sido atribuida a los efectos vasodilatadores de esta sustancia y a la activación secundaria de sistemas anti-natriuréticos. La administración concomitante de terlipresina, un vasoconstrictor con efectos inhibidores sobre los sistemas anti-natriuréticos, podría entonces facilitar la acción natriurética del FAN en estos pacientes. Hemodinámicas sistémica y renal y

factores neurohumorales fueron medidos antes y después de la administración de un bolus de terlipresina (1-2mg) asociado a una perfusión de FAN (15 ng/kg.min durante 30 min), en 8 pacientes con una ascitis refractaria. El índice cardíaco disminuyó significativamente mientras que la presión arterial no fue modificada. Las concentraciones plasmáticas de renina, aldosterona y noradrenalina disminuyeron significativamente (50%, 13% y 45%, respectivamente). Un incremento significativo del flujo sanguíneo renal (de $0,85 \pm 0,12$ a $1,24 \pm 0,10$ L/min) se asoció a un aumento no significativo del filtrado glomerular (de 76 ± 11 a 85 ± 11 ml/min). La diuresis y la natriuresis aumentaron significativamente (de 29 ± 2 a 42 ± 3 ml/h y de $0,14 \pm 0,01$ a $0,49 \pm 0,12$ mmol/h, respectivamente). El consumo renal de oxígeno se redujo significativamente (39%). En conclusión, este estudio muestra la existencia de un efecto natriurético de la asociación de la terlipresina y el FAN en pacientes con cirrosis y ascitis refractaria. La desactivación de los sistemas anti-natriuréticos secundaria a la vasoconstricción determinada por la terlipresina podría explicar el restablecimiento del efecto natriurético del FAN.

42. El factor natriurético auricular (ANF) modula la secreción biliar a nivel del sistema nervioso central (SNC). L Bianciotti, M Vatta, R Ambros, G Fernández, V Trípodí*, C Vescina* & B Fernández.

Cátedras de Fisiología, Fisiopatología y Química Analítica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.*

En trabajos anteriores demostramos que el ANF disminuye la secreción biliar total a expensas de la fracción ácido biliar dependiente tanto espontánea como inducida por sales biliares. El objetivo del presente trabajo fue estudiar los efectos del ANF administrado intracerebroventricular (ICV) sobre la secreción biliar en la rata. Se utilizaron ratas Sprague-Dawley a las que se les colocó una cánula ICV por estereotaxia. A las 48 hs se realizó la canulación del conducto hepático común y luego de un período de estabilización (10 min) se administró vía ICV ANF o LCR artificial (grupo control [C]) recogiéndose muestras de bilis a los 15, 30, 45 y 60 min. Los resultados se expresan como flujo biliar en ml/min 100g PC±ESM*: $p < 0,05$ comparado con el control correspondiente. C: 15min: $4,77 \pm 0,18$; 30min: $4,64 \pm 0,12$; 45min: $4,31 \pm 0,10$; 60min: $4,26 \pm 0,16$. ANF 1ng/ml: 15min: $4,26 \pm 0,43$; 30min: $3,53 \pm 0,24$ *; 3,29±0.13*; 60 min: $3,20 \pm 0,21$; ANF 10ng/ul: 15 min: $3,37 \pm 0,42$ *; 30min: $3,20 \pm 0,36$ *; 45min: $2,86 \pm 0,34$ *; 60min: $2,80 \pm 0,39$ *; ANF 100ng/ml: 15min: $3,53 \pm 0,20$ *; 30min: $3,41 \pm 0,14$ *; 45min: $3,27 \pm 0,14$ *; 60min: $3,14 \pm 0,20$ *. Estos resultados indican que el ANF modula la secreción biliar a nivel del SNC y sugieren la participación de una vía nerviosa en dicho proceso.

43. La ingestión de una dieta hiperlipídica crónica intensifica la pancreatitis aguda por ceruleína en la rata. MA Cresta, O Ponzo, R Resnik, DO Rondina, E Mareso, J Moguilewski, P Scacchi.

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

La litiasis vesicular y coledociana provocan pancreatitis aguda (AP), asociadas frecuentemente a ingestión de una dieta hiperlipídica. La obesidad es un factor pronóstico independiente. **Objetivos:** Evaluar en la rata el efecto de una dieta hipergrasa (HL) crónica, sobre parámetros histopatológicos y la lipasemia frente a una AP inducida con Ceruleína (CR) supramáxima. **Metodología:** ratas macho adultas con una dieta HL (lípidos 40%) durante 6 semanas, se compararon con controles (lípidos 4%) (Co), determinándose lipasemia basal en sangre; luego se indujo una AP con CR (50 µgr/kg peso), a las 2 hs se determinó lipasemia, y se extrajeron los páncreas para microscopía, efectuándose un "score histopatológico" para edema, necrosis, vacuolización e infiltrado inflamatorio. **Resultados:** La AP inducida en Co presenta aumento del edema intersticial, e infrecuente cariorrexis, y vacuolización en células acinares. En el grupo HL, hay un incremento significativo de la vacuolización y el edema no sucede así con la necrosis celular. En los dos grupos se incrementa la lipasa. **Conclusiones:** Se concluye que la dieta HL intensifica la vacuolización y el edema de la AP por CR. La vacuolización de las células acinares sería mediado por proteasas, ya que su bloqueo inhibiría el edema y vacuolización, también intervenirían los radicales libres, ya que se bloquearían con enzimas tipo "scavenging".

44. Trasplante Ortotópico de hígado (T.O.H) en cerdos. Estudio de parámetros predictivos de sobrevida inmediata. M.A Secchi, E.Peralta, E.Tagliaferri y J. Scrigna

Unidad de Medicina Experimental. Hospital Italiano de Rosario.

Realizamos 17 T.O.H en cerdos. Se utilizó la técnica clásica descripta por Calne. Fueron divididos en 2 grupos: G-1: n=8: sobrevivieron menos de 6 hs post reperusión (2,3±0,7hs) G-2: =6 sobrevivieron más de 6 hs (47±24 hs). Se evaluaron 34 parámetros 1 hora luego de reperfundido el injerto. **Resultados** Sólo 10 parámetros predijeron mortalidad del receptor 1) Permeabilidad de la anastomosis arterial: G-1: 50% y G-2: 100% (p<0,001) 2) Producción de bilis intraoperatoria: G-1: 25% y G-2: 80% (p<0,05%). 3) Pérdida de sangre intraoperatoria: G-1: 1,8±0,9 L y G-2: 0,8±0,1 L (p<0,01). 4) Reposición de sangre intraoperatoria: G-1: 2,0±0,8 L y G-2: 0,9±0,7 L (p<0,01) 5). Presión arterial media (PAM) G-1: 22,5±11 y G-2: 59,3±27 mmHg (p<0,05) 6) Bilirrubinemia: G-1: 0,39±0,15 G-2: 0,18 ±0,01 mgr% (p<0,01) 7) Bicarbonato arterial: G-1: 15±3 y G-2: 29±9 meq/L (p<0,05). 8) PH arterial: G-1: 7,18±0,11 y G-2: 7,30±0,7 (p<0,05). 9) Hto: G-1: 23±8 y G-2: 31±5 (p<0,05). 10) Saturación de O₂ G-1: 96,6±3,8 y G-2: 99,8-0,12% (p<0,05) **Conclusiones:** 1- Puede interrumpirse la reanimación si se asocian 5 o más de estos factores: Haber transfundido más de 1,6L de sangre y tener un hematocrito inferior a 30, PAM menor de 40 mmHg, falta de producción de bilis, Bic. inferior a 18 meq/L, pH menor de 7,20, SO₂ inferior a 98% o mala

arterialización del injerto. 2- Este algoritmo para la Fase de reperusión puede ser utilizado para limitar más específicamente los controles intraoperatorios y poder formular un pronóstico de sobrevida.

45. Rol del factor de crecimiento hepatocitario (HGF) en la fase inicial de la Regeneración Hepática. E Tagliaferri, E Peralta, M. Vucko, J. Scrigna y M. Secchi.

Unidad de Cirugía Experimental, Hospital Italiano, Rosario.

En el presente estudio, la utilización de Anti rh-HGF se propone demostrar que el efecto estimulador del HGF se produce en las primeras horas del proceso de regeneración. **Material y métodos:** Los animales fueron divididos en 4 grupos, I hepatectomía del 70% e inyección en bolo de 75 µgr. de anti rh HGF inmediatamente después de la hepatectomía (a tiempo cero), II sólo hepatectomía del 70%, III Sham operación (sólo manipulación), IV grupo control (sin manipulación). Los animales fueron sacrificados a las 24 hs. y recibieron una inyección de 3H-Timidina 50 mCi dos horas antes del sacrificio. Todos los grupos fueron comparados con el grupo I por el test de Student. **Resultados:** La síntesis de ADN en el grupo I fue: 59847±7739, grupo II: 180725±38353, grupo III: 43511±3984 y grupo IV: 19924±1545 DPM/mgr DNA. GI vs. GII: p<0,001; GI vs. GIII: p<0,01; GI vs. GIV: p<0,001. **Conclusión:** 1-La acción del HGF se desarrolla en etapas tempranas de la síntesis de ADN y la simple inyección en bolo de anti rh-HGF fué efectiva para neutralizar su acción. 2-El uso efectivo de anticuerpos anti HGF de otra especie demuestra que el HGF no es específico de especie 3-La inhibición de la respuesta parenquimatosa regenerativa en el hígado hepatectomizado por neutralización in vivo del HGF provee una evidencia directa de que esta sustancia estimulante juega un rol importante en el proceso de regeneración hepática.

46. Preservación hipotérmica de hígado en solución de la Universidad de Wisconsin (UW). Estudio de la respuesta vascular en el hígado aislado y perfundido de rata. JV Rodríguez, *EE Guibert, *MG Mediavilla, A Scandizzi, G Furno y ME Mamprin.

*Farmacología, *Biología Molecular Animal, IFISE, Fac. Cs. Bioq. y Farm. Universidad Nacional de Rosario.*

La función hepática post trasplante depende de las condiciones de preservación y de la reducción de los daños asociados a la reperusión. Por esta razón se decidió estudiar el efecto que la isquemia fría produce sobre el lecho portal intrahepático de hígados de ratas Wistar, preservados en UW durante 24 y 48 horas a 4 °C y luego reperfundidos en un sistema aislado con sol. Krebs-Henseleit-Albúmina Bovina. Se obtuvieron curvas Presión-flujo incrementado gradualmente el flujo portal (0,5 - 4 ml.min⁻¹.g.hig) y registrando continuamente la

presión de perfusión. Del análisis de regresión se determinó la pendiente Ri: resistencia incremental ($\text{mmHg} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min} \cdot \text{g} \cdot \text{hig.}$) y por extrapolación a flujo 0 Pc: presión crítica (mmHg). Ri es una medida de la obstrucción mecánica al flujo y Pc una estimación del tono vascular. La isquemia fría produjo un incremento de Ri a las 24 y 48 hs (control: $1,067 \pm 0,085$, $n=29$; UW24: $8,799 \pm 1,799$, $n=24$, $p<0,01$; UW48: $3,568 \pm 1,016$, $n=32$, $p<0,01$). La Pc no mostró cambios para 24 horas, incrementándose significativamente para las 48 horas de hipotermia (control: $0,803 \pm 0,256$, $n=29$; UW48: $7,022 \pm 1,464$, $n=32$, $p<0,01$). En conclusión, se observa una evolución del daño que se inicia con obstrucción al flujo de perfusión y en 48 hs culmina con la instalación de una contracción vascular no revertida por vasodilatadores (Nitroprusiato de Sodio, Pentoxifilina) en la reperfusión.

NEUROINMUNOENDOCRINOLOGIA

- 47. Disminución de la densidad e incremento de la heterogeneidad de la distribución neuronal en el área 38 de cerebros esquizofrénicos.** E F Albanese, AB Merlo, EB Tornese, MF de Recondo, TA Mascitti, EE Gómez, JH Miño, AM Albanese.

Fac. de Farmacia y Bioquímica. UBA. Fac. de Medicina. UBA. Fac. de Medicina. Universidad del Salvador. Hospital Braulio Moyano. Buenos Aires.

OBJETIVO: comparar la densidad (D) y la heterogeneidad de la distribución (H) neuronal en el área 38 de la corteza cerebral de controles (C), $n=4$ y esquizofrénicos (E), $n=4$. Las D (media $\pm$ ES) de C y E fueron en las capas I a III en el hemisferio derecho (Hd) $32,18 \pm 0,26$ y $28,64 \pm 0,26$ ($p<0,01$) y en el izquierdo (Hi) $32,92 \pm 1,00$ y $28,59 \pm 0,63$ ($p<0,01$); en las capas IV a VI $66,85 \pm 0,57$ y $67,72 \pm 0,08$ y $66,07 \pm 0,11$ y $67,87 \pm 0,72$ ($p<0,05$). Los coeficientes de variación de dichos valores son significativamente mayores en las esquizofrénicas. La disminución de la densidad neuronal y el incremento de los coeficientes de variación en las esquizofrénicas son indicativos de alteración estructural en la corteza cerebral.

- 48. Regulación de la expresión del sistema interleuquina-1 (IL-1) en monocitos humanos por proteínas del gen de la proopiomelanocortina.** D Kovalovsky, M P-Páez Pereda, E Arzt*.

*Instituto de Investigaciones Médicas Facultad de Medicina, UBA-Departamento de Biología-FCEN, UBA, *CONICET. Buenos Aires.*

Las hormonas del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) regulan la respuesta inmune: los glucocorticoides inhiben la expresión y liberación de interleuquina 1b (IL-1b) y su antagonista endógeno (IL-1ra) ante la estimulación por endotoxina bacteriana (LPS), mientras que CRH posee un efecto trifásico dependiendo de la presen-

cia o no y la concentración de LPS utilizada. En este trabajo nos centramos sobre los efectos directos de dos productos del gen de proopiomelanocortina (POMC), ACTH y b-endorfina, sobre la regulación de IL-1b e IL-1ra en cultivos de monocitos humanos, analizando la expresión génica por Northern blot y la liberación de la proteína al medio de cultivo por ELISA. Se extrajeron los linfocitos de sangre humana por el método Ficoll-Hypaque. Se purificaron los monocitos por una adherencia de dos horas y luego fueron estimulados por 3 horas para Northern-blot o 16 hs para medir la proteína con o sin LPS ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) mas ACTH ($10 \mu\text{M}$) o b-endorfina (100nM , 1nM , 10pM). Se observó una disminución en la expresión de IL-1b e IL-1ra, así como de la liberación de IL-1ra por ACTH ($75-87\%$, $p<0,01$), ante el estímulo de LPS, sin que tenga algún efecto sobre la expresión o liberación basal. b-endorfina por el contrario, en sus dosis más bajas (1nM y 10pM) produce un aumento significativo ($17-66\%$, $p<0,05$) en la liberación y expresión basal de IL-1ra sin afectar la expresión de IL-1b. Este efecto fué revertido por naloxona ($1 \mu\text{M}$). Concluimos que ACTH (al igual que los glucocorticoides) regulando negativamente a ambos genes, ejerce un control del sistema activado. Sin embargo b-endorfina mantiene un tono inhibitorio global regulando positivamente a IL-1ra.

- 49. La concentración de la fracción libre de corticosterona es incrementada durante la fiebre inducida por la endotoxina de Escherichia coli (LPS).** R Cabrera, M Korte, EM Lentjes, F Rominjn, E SchØnbaum, A De Nicola y R De Kloet.

Division of Medical Pharmacology, Leiden/Amsterdam Center for Drug Research, Sylvius Laboratory, University of Leiden, Leiden, Holland.

La relación entre la fiebre inducida por la endotoxina de E. Coli (LPS) y la biodisponibilidad de corticosterona y aldosterona fue estudiada en ratas Wistar machos. Un sistema de biotelemetría fue implantado intraabdominalmente para monitorear en forma permanente la temperatura corporal, frecuencia cardíaca y actividad locomotora; al mismo tiempo fueron sometidos a canulación yugular crónica. Luego de un período de 12 días de recuperación fueron sangrados posterior a la inyección intraperitoneal de LPS ($2,5 \text{ mg}/\text{kg}$) o salina, para realizar la estimación de los niveles de corticosterona total, la fracción libre de esta hormona y aldosterona en plasma, simultáneamente con las modificaciones de los parámetros fisiológicos. El LPS indujo un incremento sostenido de la temperatura corporal ($P<0,001$) y la secreción hormonal (corticosterona y aldosterona) ($P<0,019$), sin aumentar la frecuencia cardíaca, comparado con el grupo control. Esta fiebre inducida por LPS fue acompañada por un significativo incremento en la relación corticosterona libre/total ($P<0,02$) en comparación con la obtenida en los animales controles. Concluimos que la fiebre inducida por LPS en ratas produce incremento en la fracción biológicamente activa de corticosterona.

50. Participación de la vía central serotoninérgica en la respuesta hipotálamo-hipofisis-adrenal durante el shock endotóxico. A Giovambattista, AN Chisari y E Spinedi.

Unidad de Neuroendocrinología, IMBICE, 1900 La Plata. Buenos Aires.

El presente trabajo tuvo como objetivo el determinar si existe una participación de la vía central serotoninérgica (5HT) sobre la activación del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal (HHA) durante el shock endotóxico (LPS). Con este objetivo, ratas macho adultas fueron o no inhibidas de la síntesis de serotonina (5HT) central 26 hs antes del shock endotóxico (inyección de LPS; 130 ug/Kg). Nuestros resultados indican que la inhibición de la síntesis de 5HT no modificó la hipoglucemia ocurrida a las 2 h posteriores a LPS (de $1,22 \pm 0,02$ a $0,95 \pm 0,04$ g/l) aunque sí disminuyó ($P < 0,05$) la liberación de ACTH en plasma (de $659,7 \pm 38,1$ a $430 \pm 39,1$ pg/ml), siendo suficiente para obtenerse una similar respuesta adrenal. La falta de 5HT, si bien no modificó la actividad neuronal CRH, disminuyó ($P < 0,05$) la cantidad de vasopresina (AVP) hipotalámica basal (de $43,1 \pm 9,8$ a $26,1 \pm 4,4$ ng). La inyección de LPS en ratas inhibidas de la síntesis de 5HT reveló que el sistema neuronal AVP resulta activado: disminuyendo ésta, aunque no significativamente, en hipotálamo y aumentando significativamente ($P < 0,05$) en EM (de $7,2 \pm 2,1$ a $14 \pm 1,2$ ng), mientras que en las ratas controles y tratadas con LPS no se observaron variaciones significativas. Nuestros resultados avalan que la disminución de la actividad del eje HPA durante el shock endotóxico en ratas inhibidas de la síntesis de 5HT estaría, al menos parcialmente, compensada por una facilitación de la actividad neuronal principalmente vasopresinérgica. (Subvención de CIC-CONICET)

51. Activación de proteína quinasa C (PKC) por agonistas del receptor β adrenérgico (β AR) en una línea hiperproliferativa. G Cremaschi, AM Genaro, C Cazaux, C Anesini, TG Borda, L Sterin-Borda.

CEFYO-CONICET y Dep. Fisicomatemática, Fac. Farmacia y Bioquímica - UBA. Buenos Aires.

Anteriormente describimos una disminución en la expresión y funcionalidad de β AR en cél de linfoma T, BW 5147. En el presente trabajo estudiamos el acople de β AR a sistemas enzimáticos intracelulares. Se determinó la actividad de adenilato ciclasa (a.c.) y de PKC por incorporación de 32 P al AMPc y al MBP (4-14) respectivamente. Comprobamos que los β AR están desacoplados al sistema a.c. y que el isoproterenol (ISO) indujo a los 3 min de incubación, traslocación de PKC (pmol/min/107 cél) valores citosol/membrana: basal= $26,7 \pm 1,8$ / $4,0 \pm 0,4$ vs ISO (1 μ M)= $16,6 \pm 1,7^*$ / $20,3 \pm 1,9^*$, $p < 0,01$, $n = 5$. Este efecto fue bloqueado por propanolol (10 μ M), por genisteína (15 μ g/ml), por verapamil (1 μ M) y fue mimetizado por dbAMPc (0,1 mM). El bloqueo de PKC por staurosporina (STAU) (1 nM) incrementó los β AR (no sitios/cél): basal= $56,0 \pm 6,0$ vs STAU= $154,5 \pm 12,8^*$, $*p < 0,001$, $n = 3$. Concluimos que los

β AR en estas cél están anormalmente acoplados a una activación de PKC que modularía la expresión de β AR y la capacidad proliferativa.

52. Cambios en el metabolismo de dopamina (DA) y serotonina (5HT) en hipotálamo mediobasal (HMB) de rata luego de gangliectomía cervical superior (Gx) y trasplante hipofisario. DP Cardinali, A Arce, RM Muñoz, MA Villanúa, AI Esquifino.

Dep. Fisiología, Fac. Medicina, Universidad de Buenos Aires, y Dep. Bioquímica, Fac. Medicina, Univ. Complutense, Madrid.

Previamente hemos demostrado la existencia de una proyección de los ganglios simpáticos cervicales superiores al HMB. El presente estudio fue efectuado para analizar el efecto de la Gx sobre el metabolismo de DA y 5HT en HMB, evaluado por HPLC en ratas normales o portadoras de trasplante hipofisario. A los 8 días de la Gx, la concentración de DA y 5HT en HMB aumentó en un 34 y 32% ($p < 0,05$) y su metabolismo, estimado por los índices DOPAC/DA y HIAA/5HT, disminuyó en un 28 y 35% ($p < 0,02$). En un segundo experimento, ratas adultas con trasplantes hipofisarios en los músculos pectorales desde el 5° día de vida fueron Gx y estudiadas 8 días más tarde. En ratas trasplantadas los niveles hipotalámicos de DA, DOPAC, HVA y 5HT aumentaron 43, 31, 28 y 34% ($p < 0,02$), y los de HIAA disminuyeron 29%, efectos suprimidos por la Gx ($p < 0,05$). Luego del trasplante hipofisario se incrementó en 97% el índice DOPAC/DA y disminuyó en 37% el índice 5HIAA/5HT, siendo ambos efectos revertidos por la Gx ($p < 0,01$). Los niveles de prolactina (ng/ml) fueron: controles $5,1 \pm 1,1$; trasplante $9,7 \pm 1,0$; trasplante + Gx $19,6 \pm 2,3$, con diferencias significativas entre grupos ($p < 0,01$). La Gx aumentó los niveles séricos de GH en ratas con trasplante hipofisario en 85% ($p < 0,01$). Estos datos indican que la Gx afecta diferencialmente el metabolismo de DA y 5HT en HMB de ratas controles o con trasplante hipofisario.

53. Ritmo circadiano en actividad ornitina descarboxilasa (ODC) y síntesis de norepinefrina (NE) y acetilcolina (Ach) en ganglios submaxilares de rata. Efectos de la pinealectomía, simpatectomía cervical y melatonina. DP Cardinali, R Cutrera, P Castrillón, AI Esquifino.

Dep. Fisiología, Fac. Medicina, Universidad de Buenos Aires, y Dep. Bioquímica, Fac. Medicina, Univ. Complutense, Madrid.

La ODC es un marcador de proliferación celular en tejidos linfáticos. El objetivo de este estudio fue verificar si los cambios diarios en ODC de ganglios submaxilares de ratas eran afectados por la pinealectomía (Px), gangliectomía cervical superior (Gx) o tratamiento con melatonina. Se evaluó también la síntesis ganglionar de NE (por la actividad de la tirosina hidroxilasa) y de ACh (por la conversión de 3 H-colina en 3 H-acetilcolina). En

controles se detectaron ritmos circadianos en actividad ODC y síntesis de NE y ACh ganglionares, con máximos a las 1300-1700 h, 2100 - 0100 h y 1300 - 1700 h, respectivamente ($p < 0,01$). Luego de la Px, el valor medio de estos ritmos disminuyó en un 42-53%, sin modificación de sus acrofases ($p < 0,01$). La Gx eliminó el ritmo de ODC y redujo su valor medio a un 30 % de los animales con operación simulada. El tratamiento con melatonina, 30 mg, s.c. a las 1700 h durante 11 días, revirtió la depresión de los ritmos circadianos en ODC y síntesis de NE y ACh ganglionares verificados en ratas Px o Gx, y aumentó su valor medio en los animales con operación simulada ($p < 0,01$). Estos resultados indican que la glándula pineal participa en los cambios circadianos de actividad inmune ganglionar en ratas a través de un efecto inmunopotenciador de la melatonina.

54. Reserva hipofisaria y respuesta a los estrógenos en ratas alimentadas con dietas aprotéicas. O Ponzio, DO Rondina, B Szwarcfarb, S Carbone, JA Moguilevsky, P Scacchi

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, U.B.A.

El ayuno (Ay) y las dietas aprotéicas (Ap), disminuyen las gonadotrofinas; acompañado de un aumento en la concentración de Gn-RH, sin afectarse su liberación basal. La Noradrenalina y la Dopamina también disminuyen en los Ap. Continuando con esta estudios se analizó la reserva hipofisaria de LH y FSH, la concentración hipofisaria de gonadotrofinas y el "feed-back positivo" a los estrógenos en hembras. En ratas macho adultas alimentadas 21 días con dieta Ap y controles (C), se inyectaron 100 ng de Gn-RH ip y se obtuvo sangre 30 minutos después. Se observó que el LH (determinado por RIA) se incrementó por el Gn-RH en los controles ($22,3 \pm 5,9$ vs $41,1 \pm 5,9$) y en Ap ($3,14 \pm 0,99$ vs $32,4 \pm 7,0$). El FSH en los C se incrementó ($115,6 \pm 11,6$ vs $150,0 \pm 16,7$) no cambiando en los Ap ($61,9 \pm 8,6$ vs $69,6 \pm 16,5$). La concentración de LH en homogenatos de hipófisis de las Ap presenta un descenso (6187 ± 600 vs 1844 ± 209 ng/mg tejido) igualmente el FSH (17483 ± 1650 vs 7595 ± 879) con respecto a los controles. En la respuesta a los estrógenos (hembras castradas) el LH aumentó en los (C) ($317,8 \pm 40,6$ vs 1686 ± 302 ng/ml) y en Ap ($280,5 \pm 48,6$ vs 3366 ± 3029). El FSH aumentó en C (385 ± 50 vs 942 ± 152) y en Ap (623 ± 102 vs 2005 ± 313). En ambos casos la respuesta fue mayor en los Ap (Test de varianza de Newman-Keuls). Las dietas Ap a pesar de tener descendido el contenido de gonadotrofinas en hipófisis responde al Gn-RH y a los estrógenos; en ambos casos el incremento fue mayor. Se considera la posibilidad de un bloqueo a nivel hipotalámico.

CARDIOVASCULAR I

55. Concentración tisular de óxido nítrico y efectos de la bradiquinina en el corazón de rata. CL Lisdero, JG Peralta, MC Carreras, FJ Schöpfer, NA Riobó, P Aragón y JJ Poderoso.

Lab. Metabolismo del Oxígeno. Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.

Hemos demostrado que la citocromo oxidasa de mitocondrias de corazón de rata se inhibe a bajas concentraciones de óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) ($0,05-0,1 \mu\text{M}$). Los objetivos de este estudio fueron analizar las probables concentraciones celulares fisiológicas miocárdicas y los efectos metabólicos del $\bullet\text{NO}$ liberado tras la estimulación endotelial con bradiquinina. Con el primer objetivo, se congelaron en N_2 líquido corazones de rata tras la perfusión con $\bullet\text{NO}$ auténtico ($2-7 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$); cortes finos ($20 \mu\text{m}$) fueron colocados en un espectrofotómetro y se determinó el área bajo la curva del espectro de la mioglobina (Mb) entre 577 y 590 nm. Los resultados demostraron una disminución del área (media $\pm$ ESM, $0,019 \pm 0,001$ a $0,011 \pm 0,001$ UAbs $\cdot\text{nm}$, $p=0,001$) por formación de $\bullet\text{NO}$ -Mb. La estimulación del corazón aislado y perfundido con bradiquinina $10^{-6} \text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ produjo descenso del consumo de O_2 miocárdico (de $5,44 \pm 0,32$ a $3,49 \pm 0,27 \text{ mlO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{gr}^{-1}$) y la detección de $\bullet\text{NO}$ y H_2O_2 en el efluente. Se sugiere que la concentración miocárdica de $\bullet\text{NO}$ efectivo es baja (10^{-7}M) por unirse a la Mb y que la estimulación endotelial fisiológica induce efectos similares al $\bullet\text{NO}$ auténtico.

56. El óxido nítrico en el corazón aislado y perfundido de rata. CL Lisdero, JG Peralta, MC Carreras, M Radisic, G Beccaglia y JJ Poderoso.

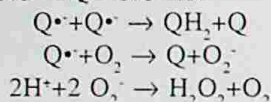
Lab. Metabolismo del Oxígeno. Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.

El óxido nítrico $\bullet\text{NO}$ ha sido recientemente implicado en la regulación del metabolismo oxidativo mitocondrial; nosotros hemos asimismo demostrado una producción mitocondrial aumentada de radicales libres del O_2 (Arch. Biochem. Biophys. 328(1), 85-92, 1996). El objetivo de este estudio fue determinar la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por el corazón de rata intacto, aislado y perfundido, tras la perfusión con $\bullet\text{NO}$. Los resultados demostraron que la perfusión con nitroso glutation (GSNO, dador de $\bullet\text{NO}$) ($100-1000 \text{ mM}$), o $\bullet\text{NO}$ auténtico ($1,5-7,5 \text{ mM}$) durante 10 min produjo una caída del consumo de O_2 entre 8-60%. Asimismo se observó un aumento en la detección de H_2O_2 con un curso ascendente y descendente en el tiempo y un pico a los 10-15 min proporcional a la concentración de $\bullet\text{NO}$ (GSNO $r=0,99$ $p=0,001$, $\bullet\text{NO}$ $r=0,98$ $p=0,02$). La producción cardíaca total de H_2O_2 se apreció en $0,2-0,3 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ lo que representa un 25% de la producción mitocondrial ($0,4 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}$). Se sugiere que en el miocardio, el $\bullet\text{NO}$ inhibe las mitocondrias y promueve la liberación de H_2O_2 , lo que probablemente sea un mecanismo regulatorio de los mismos niveles de $\bullet\text{NO}$.

57. Reacción entre el óxido nítrico y el ubiquinol, posible mecanismo de producción de radicales libres del oxígeno. FJ Schöpfer, MC Carreras, CL Lisdero, NA Riobó, A Boveris, JJ Poderoso.

Lab. de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas, Fac.de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Las mitocondrias producen superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a nivel del complejo I (NADH deshidrogenasa) y II-III (ubiquinol-cit.c reductasa). Previamente nuestro grupo demostró que mitocondrias aisladas tratadas con $\bullet NO$ liberan mayor cantidad de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 (peróxido de hidrogeno) (Arch. Biochem. Bioph. 328(1), 85-92, 1996). El objetivo de este trabajo fue establecer el mecanismo de producción de radicales libres por $\bullet NO$ en el complejo II-III. Se estudió la posible reacción entre el ubiquinol (QH_2) (5-80 μM), uno de los componentes de este complejo y el $\bullet NO$ (1-50 μM) a través del decaimiento de $\bullet NO$ medido electroquímicamente, la oxidación del ubiquinol a 275 nm y por HPLC de detección electroquímica. Los resultados indican una reacción entre el $\bullet NO$ y el ubiquinol ($k=3,2 \cdot 10^2 M^{-1} seg^{-1}$) generando anión nitroxilo ($NO^{\cdot-}$) y ubisemiquinona ($Q^{\cdot-}$), la cual en presencia de O_2 se oxida a ubiquinona (Q) liberando $O_2^{\cdot-}$. Este último dismuta produciendo H_2O_2 . Proponemos las siguientes reacciones:



58. Participación del óxido nítrico (NO) en la hipersensibilidad colinérgica de aurículas diabéticas (AD) agudas. M Wald, E Borda, L Sterin-Borda.

CEFYO-CONICET. Buenos Aires.

Previamente demostramos que el NO activando una guanilato ciclasa soluble produce un efecto inotrópico negativo (EIN) colinomimético en aurículas de rata normales (AN). En este trabajo estudiamos las señales intracelulares que median la hipersensibilidad (hsb) de las AD a los EIN del carbacol (carb) que no se acompañan por modificaciones en el B_{max} ni en el K_d de los respectivos receptores (K_d , AN: 0,28 $\pm$ 0,03, AD: 0,33 $\pm$ 0,02 nM; B_{max} , AN: 407 $\pm$ 23, AD: 370 $\pm$ 19 fmol/mg prot., n=7). No se observaron diferencias en el efecto del carb sobre la: producción de inosítoles fosfato, activación de proteína quinasa C o producción de AMPc entre AN y AD. Sin embargo, la actividad basal de la NO sintasa (NOS) fueron mayores en AD que en AN (AN: 287 $\pm$ 19; AD: 451 $\pm$ 25 pmol/g tej., n=5), con desplazamiento hacia la izquierda de la curva de carb. La producción de GMPc por las AD mostró un corrimiento paralelo al observado con NOS: GMPc AN: Carb 10^{-7} M, 86 $\pm$ 9, AD: Carb 10^{-6} M, 124 $\pm$ 15 pmol/g tej., n=5. Este efecto fue bloqueado por un inhibidor de NOS L-NMMA (5x 10^{-4} M) y por un inhibidor de tromboxano sintetasa L-8027 (10^{-6} M). Por RIA se comprobó una mayor formación de TXB_2 en AD que en AN (AN: 27 $\pm$ 4; AD: 51 $\pm$ 4 ng/g tej., n=6). Se sugiere que la hsb de la AD al carb se relaciona con una mayor actividad de NOS y producción de GMPc. En este mecanismo participaría la mayor producción de tromboxanos en AD.

59. Contribución del Óxido Nítrico (NO) y Prostanoides en la Contractilidad del Músculo Liso Vascular (MLV) de Ratas Hipertensas 2R2C. GW Vega, N Speziale, MM Celentano, MI Rosón, A Ferrero, E Palumbo, LE Albornoz, IJ de la Riva.

Fisiología, Medicina; Química Biológica Patológica, Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

La Indometacina (IND) disminuye la contractilidad del MLV a la 5-hidroxitriptamina (5-HT) en anillos de aorta abdominal de ratas 2R2C (HT) y sham (SH). Este estudio examinó dosis-respuesta a la 5-HT (10^{-8} a 5×10^{-5} M) en: A) HT(6) y SH(5), 7-15 días después de cirugía, en presencia de IND (10^{-5} M) y B) HT(11) y SH(10), 14-40 días después de cirugía, en presencia de Ridogrel (RID, 10^{-4} M, inhibidor de tromboxano sintasa y bloqueante de receptores PGH_2 y TxA_2). RESULTADOS: GRUPO A) la T_{max} disminuyó con IND en HT (<.05) y SH (<.01); GRUPO B) RID disminuyó la T_{max} en SH (<.02) y en HT (<.05). La NT-L-arginina (NOLA, 10^{-4} M) revirtió el efecto drogas sobre T_{max} y efecto depresor de IND sobre la sensibilidad de las SH. Con NOLA el RID disminuyó la sensibilidad en SH y en HT (<.05). Nitratos-Nitritos (Reacción de Griess) en plasma (μM): 22.4 $\pm$ 3.3 (HT) y 25.9 $\pm$ 2.0 (SH). La síntesis de TxA_2 (EIE) fue elevada en vasos controles con 5-HT en HT (<.02) y la diferencia desapareció con RID. CONCLUSIONES: 1) el efecto depresor IND y RID sobre T_{max} depende del NO en pared arterial; 2) el efecto RID / con NOLA sobre la sensibilidad sugiere la participación de PGI_2 en su modulación.

60. Participación del factor natriurético atrial (FNA) en la hipertensión renovascular. GW Vega, AM Puyó, A Pellegrino de Iraldi, JP Corazza, MM Celentano, MI Rosón, P Scaglia, B Fernández, IJ de la Riva.

Depto de Cs Fisiológicas e Inst de Biología Celular y Neurociencias Prof E De Robertis, Fac de Medicina y Depto de Cs Biológicas, Fac de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

En un estudio anterior (Medicina, 53:497-502, 1993) se ha descrito la disminución de los gránulos del FNA en cortes de microscopía electrónica de aurícula de ratas hipertensas 2R2C. En este trabajo se determinaron niveles plasmáticos del FNA por RIA en tres grupos de ratas: Hipertensas 2R2C (HT, 160 $\pm$ 10 mmHg, n=8), con operación simulada (SH, 125 $\pm$ 8 mmHg, n=7) e intactas (INT, n=8). Complementariamente se examinó el efecto relajante del FNA sobre anillos de la aorta abdominal contraídos con Fenilefrina (3,5x 10^{-6} M). Los resultados mostraron: FNA plasmático (ng/ml): HT: 3,74 $\pm$ 0,77; SH: 1,46 $\pm$ 0,25; INT: 0,71 $\pm$ 0,15; HT vs SH $P < 0,02$; HT vs INT $P < 0,005$, INT vs SH, NS; % relajación: HT (10) 53,6 $\pm$ 4,07; SH (9) 61,8 $\pm$ 2,29, NS. Conclusiones: 1) los elevados niveles circulantes de FNA unidos a la disminución de los gránulos atriales indicarían el aumento del recambio metabólico; 2) los menores valores de relajación de los vasos de animales HT (tendencia no significativa) en

presencia de niveles plasmáticos de FNA elevados sugieren un fenómeno de desensibilización de los receptores vasculares.

- 61. Expresión diferencial de óxido nítrico sintasa (NOS) en miocardio autoinmune experimental (MAE) y en miocardio normal (MN) murino.** N Goren, L Sterin Borda, C Pérez Leirós, E Borda.

CEFYO, CONICET. Buenos Aires.

Existen evidencias de una disfunción en el sistema L-arginina-óxido nítrico en el fallo cardíaco. Previamente hemos documentado que la disfunción contráctil en la MAE, está asociada a una expresión diferencial de receptores (R) H1, ausentes en el MN. En este trabajo se estudió el sistema de señales del NO endógeno que media la acción de histamina en la MAE y en el MN. Se observó que en la MAE la actividad basal (AB) de NOS (1234 ± 20 pmol/g tej n=6) resultó ser significativamente mayor que la AB del MN (549 ± 14 pmol/g tej n=6). Además la AB de NOS en MAE no fue modificada por la activación de RH2 por dimaprit 10^{-5} M(D) ni por la de RH1ThEA 10^{-5} M, pero sí por L-NMMA 5.10^{-4} M. La trifluoperazina (TFP) 510^{-6} M no modificó la actividad de NOS. Por otro lado la staurosporina 10^{-9} M inhibidor de PKC, disminuyó la AB de NOS (740 ± 19 pmol/g tej n=4), así como en presencia de ThEA 10^{-6} M (782 ± 17 pmol/g tej n=4). En el MN el D 10^{-5} M estimuló los niveles de AMPc (4.3 ± 0.2 pmol/mg tej n=5) y la actividad de NOS (1097 ± 19 pmol/g tej n=5). Este último efecto fue bloqueado por HA 5.10^{-6} M y TFP 5.10^{-6} M. Los resultados sugieren, que mientras en el MN predomina la NOS constitutiva, en la MAE existiría una expresión diferencial de NOS con mayor contribución de NOS inducible que podría estar vinculada con el infiltrado mononuclear del miocardio asociado a la disfunción cardíaca de la MAE.

- 62. Efectos de la insulina y de los ácidos 4-pentenoico y valérico sobre el contenido de acilcoA y acilcarnitina en aurículas hipóxicas.** A.Varela, V.Dalmon, M.Carregal, G.Testoni y E.A. Savino.

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

Los deterioros funcionales de la aurícula hipóxica se acompañan de acumulación de metabolitos de los ácidos grasos (acilcoA y acilcarnitina) y de producción de lactato. El pentenoico 2 mM si bien abolió la lipólisis, empeoró los daños e inhibió la producción de lactato. Sus efectos fueron similares a los del ácido valérico 2 mM. La insulina (12 mU/ml) ejerció efectos favorables y aumentó la liberación de lactato. La finalidad del trabajo fue investigar si los efectos mencionados se asocian con modificaciones en el contenido de los ésteres acilcoA y acil-carnitina. Se midieron acilcoA, acilcarnitina y CoA y carnitina libres en aurículas de rata latiendo espontáneamente en Krebs-bicarbonato con glucosa 11 mM, en aerobiosis seguida de hipoxia (60min). Los metabolitos

se extrajeron según Williamson y Corkey y después de hidrolizar se midieron CoA y carnitina libres por métodos UV y colorimétrico respectivamente. La estadística se hizo con ANOVA y Tukey (N=6). El pentenoico y el valérico no afectaron el contenido de acilcarnitina, CoA libre y carnitina libre, pero el contenido de acilcoA disminuyó en presencia de valérico (14.84 ± 2.59 vs 33.76 ± 4.49 nmol/g.h). El agregado de insulina al medio aumentó el contenido de acilcoA (48.52 ± 7.01 vs 33.76 ± 4.49 nmol/g.h.) y no modificó el de los otros metabolitos. Estos resultados demuestran que no existe correlación entre los efectos nocivos o beneficiosos observados y el nivel tisular de los ésteres de ácidos grasos.

- 63. Respuesta Antioxidante al Ejercicio Físico Intenso.** F Brites, P Evelson, M Garcia, M Basilico, F Nicol, S Llesuy, R Wikinski.

Lab. Lípidos y Lipoproteínas, Depto. Bioq. Clínica y Cat. Qca. Gral. e Inorgánica, FFyB., Universidad de Buenos Aires.

Durante el ejercicio físico intenso existe un proceso de stress oxidativo cuyo efecto deletéreo podría ser compensado por un aumento de las defensas antioxidantes. Se sabe además que los deportistas poseen niveles elevados de colesterol de HDL, inhibidor de la oxidación de LDL. Estudiamos un grupo de jóvenes futbolistas bajo un intenso plan de entrenamiento (n=30) y a individuos sedentarios (n=12), en los cuales evaluamos el perfil lipoproteico e indicadores del estado antioxidante. El grupo de deportistas, presentó niveles de colesterol de HDL (48 ± 9 vs 42 ± 9 mg/dl, Media $\pm$ DE, $p < 0.05$) y de HDL3 (39 ± 6 vs 34 ± 8 mg/dl, $p < 0.05$) significativamente más altos que los controles. La capacidad antioxidante total del plasma mostró un aumento significativo en los deportistas (405 ± 95 vs 319 ± 39 μ M Trolox, $p < 0.005$). Estos resultados fueron coincidentes con la mayor concentración de ácido ascórbico (97.7 ± 42.0 vs 39.5 ± 42.5 μ M, $p < 0.005$) y de ácido úrico (5.5 ± 0.8 vs 4.2 ± 0.7 mg/dl, $p < 0.0001$) en estos individuos. De esta manera, la elevación de HDL, a la cual se le atribuye un rol protector de la oxidación de lipoproteínas, y el aumento de la capacidad antioxidante del plasma contribuirían al sistema defensivo contra las especies activas del O₂ durante el ejercicio intenso.

INFECCIOSAS

- 64. Desarrollo de una técnica de neutralización para la detección de anticuerpos contra el virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCM).** A Ambrosio, M Saavedra, J Sottosanti, M Feuillede, L Riera.

INEVH «Dr. J Maiztegui». Buenos Aires.

Debido a su alta especificidad las técnicas de Neutralización (NT) resultan decisivas en el diagnóstico de infección por los arenavirus que conocidamente coexisten en la región pampeana. En este trabajo se presenta

el desarrollo y evaluación de una NT realizada con una cepa autóctona de virus LCM (An 13065). Los sueros en estudio, diluidos factor 2 desde 1:5 se enfrentaron a 2000 utp/ml del virus, y la capacidad neutralizante de estos se reveló en células L bajo agarosa, expresándose los títulos como la máxima dilución del suero que reduce el 80% de las placas. La técnica de NT descripta resultó en una reproducibilidad del 81%, con una variación menor que una dilución en los títulos obtenidos. La sensibilidad y especificidad de esta técnica resultaron en 97,5% y 71,4% respectivamente para un valor de corte determinado en 1:5; que permite esperar 2,5% de falsos negativos ($\alpha = 0,025$). La NT presentada ha resultado de gran utilidad para dilucidar con certeza si un cuadro febril compatible con infección por arnavirus ha sido causado por el virus LCM.

65. Comparación entre neutralización (NT) y Elisa para la detección de anticuerpos contra el virus de la corioeningitis linfocitaria (LCM). A Ambrosio, L Riera, J Sottosanti, M Feuillade, M Saavedra.

INEVH «Dr. J. Maiztegui». Buenos Aires.

Para discriminar etiológicamente las infecciones por los distintos arnavirus que coexisten en el área endémica de Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA), es recomendable la utilización de técnicas de NT por su alta especificidad. En este trabajo se comparan los resultados obtenidos por Neutralización de placas de la cepa 13065 del virus LCM en células L y por ELISA para captura de IgG específica utilizando la cepa Armstrong del virus LCM. Se estudiaron las siguientes muestras: 1) Sueros pareados (0 y 60 días post comienzo de los síntomas) de pacientes con FHA (n=83) y 2) Sueros de encuestados, seronegativos para Virus Junin (n=48). Resultados: En 1) la NT detectó una proporción significativamente mayor de positivos para LCM en los sueros del período agudo y la convalecencia ($p < 0,01$). En ambos grupos la concordancia entre las técnicas fue $k=0,34$ y $k=0,47$ respectivamente. En 2) no se observó diferencia significativa entre ambas técnicas ($p > 0,05$) encontrándose el más alto nivel de concordancia ($k=0,62$). Conclusión: NT y ELISA resultan equivalentes en estudios poblacionales. La NT es la técnica de elección para detectar infecciones previas por virus LCM en individuos que cursan una FHA.

66. Comparación de tests de diagnósticos en córnea de pacientes con probable queratitis herpética. A. Berra (*); J. Tosi (), R. Tarrab (**)**

(*)Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires y (**) Centro Privado de Ojos, Buenos Aires.

Introducción: La mayor causa de ceguera infecciosa en los países desarrollados es la queratitis herpética. El diagnóstico definitivo puede hacerse dentro de los 7 días de tomada la muestra por aislamiento e identificación del Herpes virus (HSV) mediante cultivos celulares. La cantidad de muestras de córnea que se pueden tomar en pacientes con queratitis probablemente

herpética es muy pequeña. **Métodos:** Se tomaron 20 pacientes con probable queratitis herpética. Las muestras de córnea fueron tomadas con hisopos de dacron. Los hisopos fueron puestos en medio HEPES para el posterior aislamiento viral, en medio 2SP para la posterior PCR y se efectuó un frotis para la Inmunofluorescencia directa (IFD). El aislamiento viral se efectuó evaluando el efecto citopático en células VERO. La presencia de HSV en los cultivos fue identificado por IFD. Para la PCR fueron utilizados 30 ciclos para evaluar la presencia de HSV sobre el DNA aislado. Para la IFD se emplearon anticuerpos monoclonales específicos para HSV marcados con isotiocianato de fluoresceína. **Resultados:** De los 20 pacientes estudiados, 9 tenían una presentación típica de herpes corneal. La PCR fue positiva en la córnea en los 9 casos, el cultivo en 6 casos y la IFD en 2 casos. Once pacientes tenían una presentación atípica donde el origen herpético era dudosa. Se obtuvo en córnea PCR positiva en 4 casos, 2 por cultivo y 1 por IFD. Todos los casos típicos y los atípicos con PCR positiva fueron tratados con trifluorotimidina al 1% tópico. Se observó una curación del 100% de los casos entre los 2 y 11 días de tratamiento. Los casos atípicos con laboratorio negativo fueron tratados con lubricantes y regeneradores de epitelio corneal y evolucionaron favorablemente. **Conclusión:** En presuntas queratitis herpéticas los procedimientos de laboratorio no son generalmente usados por los oftalmólogos y los pacientes son tratados por el diagnóstico clínico. Las queratitis herpéticas atípicas pueden ser mal diagnosticadas, siendo el laboratorio fundamental para efectuar el diagnóstico de certeza. De la evaluación entre el diagnóstico clínico, los tests diagnósticos de laboratorio y el resultado del tratamiento, nuestros datos sugieren que la PCR es el test de elección en muestras de córnea de pacientes con formas típicas y atípicas de queratitis herpética.

67. Análisis multivariado de la respuesta de hipersensibilidad tardía (RHT) hacia tuberculina (TU) y leprosin a (LA) en convivientes de enfermos de lepra. Bottasso OA, Merlin V, Morini J, Poli H, Wojdyla D, Stanford JL.

Instituto de Inmunología de la Facultad de Ciencias Médicas de Rosario, Depto de Microbiología Médica, University College de Londres.

Se estudió si factores como sexo, edad, cicatriz de BCG, duración y tipo de contacto con enfermos de Lepra (multi o paucibacilares), podían influenciar la RHT hacia la TU y LA. Para ello 435 contactos de Lepra (254 mujeres y 181 varones, edad 27 « 18 años, media « ds) fueron desafiados por vía id, con 0.1 ml de tales antígenos y la reacción ≥ 2 mm se consideró positiva. El examen de los factores sobre la negatividad a TU y LA se efectuó en base a un análisis de regresión logística. Los resultados se expresaron como coeficientes de desigualdad relativa (Odds Ratio), con intervalo de confianza al 95%. La chance de respuestas negativas a la LA en las mujeres y en los no vacunados con BCG fue 1,54 (1,01-2,36, $p < 0,05$) y 2,73 (1,42-5,26, $p < 0,005$) veces mayor, respectivamente. Asimismo se observó una dismi-

nución en el riesgo de respuestas negativas por cada 10 años de incremento de la edad del conviviente [0,78 (0,66-0,92, $p < 0,005$)]. Los resultados con la TU indicaron que la negatividad hacia la misma aumentaba en aquellos que no poseían cicatriz de BCG = 1,85 (1,11-3,07) y en las mujeres = 1,91 (1,25-2,92), $p < 0,005$. Los demás factores no mostraron asociaciones significativas. Estos resultados refuerzan la importancia de la vacunación con BCG y el sexo en la respuesta inmune celular hacia micobacterias relevantes en la patología infecciosa.

68. La susceptibilidad de individuos inmunes a virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCM) a la infección con virus junin. A Ambrosio, M Saavedra, L Riera, J Sottosanti, M Sabattini.

INEVH «Dr. J. Maiztegui». Buenos Aires.

Se ha demostrado que en el 88% de los pacientes de Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) que presentan anticuerpos neutralizantes para LCM, estos provienen de una infección previa a la de VJ. Dado que otros autores demostraron cruces serológicos protectores entre arenavirus, asR como la existencia de una fracción genómica común a todos ellos, en este trabajo se investigó si en los individuos inmunes a LCM se modifica el riesgo de enfermar de FHA o si, en caso de enfermar, se presentan diferencias en el cuadro clínico o la mortalidad de la enfermedad. Se compararon mediante pruebas de X^2 : a) el porcentaje de pacientes de FHA con anticuerpos para LCM ($n = 3109$) con el porcentaje de positivos para LCM en una población encuestada ($n = 7227$); b) la distribución de FHA leve y grave entre pacientes con y sin anticuerpos para LCM ($n = 3109$); c) La proporción de fallecimientos por FHA en presencia o ausencia de anticuerpos para LCM. Se encontró que la presencia de anticuerpos para LCM no modifica significativamente la posibilidad de contraer FHA, la frecuencia de enfermedad grave ni la mortalidad por FHA ($p > 0,05$), lo cual indica preliminarmente que la inmunidad para virus LCM no tiene efectos protectores para la infección con VJ.

69. Seroconversión para los arenavirus junin (VJ) y coriomeningitis linfocitaria (LCM) en pacientes de fiebre hemorrágica argentina. A Ambrosio, L Riera, M Saavedra, J Sottosanti, M Sabattini.

INEVH «Dr. J. Maiztegui». Buenos Aires.

En 20 años (1972-91) se han detectado anticuerpos inmunofluorescentes (IF) para LCM en 196/3109 pacientes con Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) confirmada. La IF mostraba una seroconversión simultánea para ambos virus en el 80% de estos casos, lo que confunde el diagnóstico debido a los cruces serológicos entre VJ y LCM. En este trabajo se aplicó una prueba de neutralización (NT) para LCM a sueros pareados de 74 de estos pacientes con doble seroconversión, a fin de especificar el diagnóstico etiológico de su enfermedad. En 65/74 (87,8%) de estos individuos se detectaron anticuerpos NT

para LCM al momento de su admisión con FHA serológicamente confirmada, mientras que en 9/74 (12%) pacientes aparecieron simultáneamente los anticuerpos NT para VJ y LCM en la convalecencia de la FHA. Se concluye que en el 88% de los pacientes estudiados ocurrió una infección secuencial por LCM y VJ, mientras que el 12% restante, que constituye aproximadamente el 0,3% de los pacientes con FHA, habría enfermado por alguna variante viral con antígenos compartidos por VJ y LCM, o por un nuevo arenavirus patógeno para humanos, lo cual replantea la vigilancia epidemiológica en el área endémica de FHA.

70. Meta-análisis de los Estudios Epidemiológicos sobre Rotavirus Humanos (RVH) en la Argentina. JA Gomez, S Nates, NR de Castagnaro, C Espul, A Borsari, I Miceli:

Grupo de Estudios de Gastroenteritis Virales. Buenos Aires.

Ante la futura disponibilidad de una vacuna contra los RVH el presente grupo de trabajo, originado en el taller sobre diarreas virales desarrollado en el Instituto Nacional de Microbiología "C. Malbran", ha realizado un análisis minucioso de la información existente para determinar el impacto de los RVH en el país y evaluar las medidas a tomar en el futuro. Se analizó información publicada y no publicada de detección de RVH en 9 centros de todo el país. Se observó RVH en el 20% (rango 6-53%) de las 5226 muestras de niños hospitalizados por diarrea y en el 9% (rango 5-22%) de las 6587 muestras de pacientes ambulatorios, población mixta, y de estudios comunitarios. RVH fue detectado todo el año, con un pico de identificación en los meses de Mayo y Junio donde cerca del 50% de los niños presentaron RVH. Tres laboratorios serotipificaron 230/294 (78%) de RVH: el serotipo 1 fue el más común (60%) seguido del 2 (20%), el 4 (14%), el 3 (5%) y las no 1-4 (1%) se estimó que en 1991 hubo 169.000 pacientes ambulatorios y 21.000 hospitalizaciones asociadas a RVH con gastos por más de 27 millones de pesos. Este impacto podría ser disminuido con una vacuna segura y efectiva. Ciertas diferencias pudieron deberse a variaciones epidemiológicas entre las áreas o al diseño de los estudios, y se han identificado algunas características propias. Con esta base, se ha diseñado el "programa de vigilancia epidemiológica de diarreas virales", con un protocolo unificado, métodos de diagnóstico estandarizados y con un control de calidad inter-laboratorio. El mismo comenzará en 1996 y brindará información que permitirá evaluar activamente la posible utilización de vacunas y un mejor manejo de esta enfermedad.

71. Estudio comparativo de la eficacia antiarrítmica del sotalol vs. amiodarona en la cardiopatía chagásica crónica. R Storino, S Auger, M Benavente, J Milei.

Fundación INCALP, La Plata, Hospital Santojanni, Buenos Aires.

Objetivos: Comparar la eficacia antiarrítmica y efectos adversos de bajas dosis de sotalol vs. bajas dosis de amiodarona en pacientes chagásicos con arritmia ventricular compleja y fracción de eyección (FE) > de 40%. **Material y métodos:** Se incorporaron 40 pacientes chagásicos con arritmia ventricular compleja GII, III, IVA y IVB de Lown (EV frecuentes, polifocales, duplas y/o taquicardia ventricular) detectada por Holter de 24 hs. con cámara gamma con Tc 99 que demuestre FE > o igual a 40%. 20 pacientes (p) elegidos al azar fueron tratados con amiodarona (800 mg/día de ataque por 10 días y luego 300 mg/día de mantenimiento) y los 20 restantes con sotalol 80 a 160 mg/día según respuesta). Se realizaron controles con electrocardiograma semanal evaluando frecuencia cardíaca (FC), PR y QT. El Holter se repitió a los 30-60 y 90 días de tratamiento, considerando eficacia antiarrítmica positiva la disminución de la arritmia inicial en un 75% o mayor. **Método estadístico:** Test "Q" de Cockran. **Resultados:** La edad promedio fue de 50 años en el grupo amiodarona y de 48 años en el grupo sotalol. Se observó la siguiente eficacia antiarrítmica: A) Grupo amiodarona: 75% de los p. a los 30 días, 80% a los 60 días y 90% a los 90 días. B) Grupo sotalol: 75% (30 días), 80% (60 días) y 80% (90 días). La eficiencia terapéutica fue significativa con ambas drogas ($p < 0,01$). **Efectos adversos:** A) amiodarona: proarritmia (5%), B. AV de 1º grado (15%) y caída de FC (55%). B) sotalol: proarritmia (5%), prolongación de QT (50%) y disminución de FC (77%). No hubo complicaciones ni mortalidad. **Conclusiones:** 1) La eficacia antiarrítmica fue estadísticamente significativa a bajas dosis en ambos grupos. 2) No existieron diferencias significativas entre ambos grupos. 3) El sotalol sería una nueva alternativa en el tratamiento de la arritmia ventricular compleja en la cardiopatía chagásica crónica.

RESPIRATORIO

72. Efecto de la ventilación asal sobre los gases arteriales en pacientes con EPOC. C Gallego, G Gorjod, P Kaplan, C Nigro, E Rhodius, N Sallis

Policlínica Bancaria. Capital Federal. Buenos Aires.

Objetivo: valorar el efecto de distintas presiones de BiPAP nasal sobre la gasometría arterial en EPOC estables. Se estudiaron 7 pacientes, valores medios (DS): edad 64,3 (10,4) años; FEV1 28,3 (8,96)%; PaO2 73,9 (17,4) mmHg; PaCO2 47,7 (10,1) mmHg; autoPEEP postb2 1,01 (0,89) cmH2O. Se realizaron 3 sesiones de BiPAP de 30min. cada una: 1ª presión de soporte inspiratoria (IPAP) 9 cmH2O; 2ª IPAP 18 cmH2O; 3ª IPAP 18 cmH2O con presión positiva expiratoria (EPAP) 5 cmH2O, con gasometría arterial previo a cada ventilación y durante el último minuto. Se observaron cambios en el patrón respiratorio con disminución de la frecuencia respiratoria (basal 20,3+/-2,4, IPAP9 15,1+/-2,0, IPAP18 12,7+/-1,3, IPAP18/EPAP5 13,0+/-1,3; en todos los casos $p < 0,001$). La PaO2 aumentó más de 5 mmHg en todos los niveles de ventilación, sólo alcanzó significación estadística con IPAP 9 cmH2O (inicial

73,9+/-3,8 mmHg; final 79,6+/-17,4 mmHg, $p < 0,05$). La PaCO2 disminuyó significativamente con IPAP 18 cmH2O (inicial 47,9 +/- 10,2 mmHg; final 41,9+/-9,98 mmHg, $p < 0,05$) y con IPAP 18 cmH2O+ EPAP 5 cmH2O (inicial 45,7+/-7,6 mmHg; final 40,6+/-7,9 mmHg, $p < 0,01$). La tolerancia al método fue evaluada por medio de una escala analógica-visual. **Conclusión:** En el grupo de pacientes con EPOC severa en condición estable la ventilación nasal no invasiva produjo mejoría gasométrica, estando relacionado el grado de mejoría con el nivel de presión que se utilizó.

73. Efecto del salbutamol inhalado sobre la presión positiva al final de la espiración (autopeep) en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). CA Nigro, N Sallis, EE Rhodius-

Servicio Neumología, Policlínica Bancario, Buenos Aires.

Objetivo: valorar los cambios inducidos por el salbutamol inhalado sobre el autopeep en pacientes con EPOC en fase estable. **Materiales y métodos:** 12 pacientes con EPOC estable (65 años $\pm$ 9, FEV1 28,1% $\pm$ 14). Los parámetros evaluados en situación basal (b) y a los 30 min. de la inhalación de 400 µg de salbutamol (b2) fueron: FVC, FEV1, VC, IC, TGV, RV, TLC, RV/TLC, RAW, SGAW, VT, FR, VE, VT/TI, TI/TOT, presión esofágica pico (Pesp) y autopeep (AP= cambio de Pes desde el comienzo del esfuerzo inspiratorio hasta el punto de flujo cero). **Resultados:** aumentaron en forma significativa luego del salbutamol ($p < 0,001$): FVC (1,8 l $\pm$ 0,72 / 2,27 l $\pm$ 0,73), FEV1 (0,77 l $\pm$ 0,36 / 0,95 l $\pm$ 0,36), VC (2,26 l $\pm$ 0,79 / 2,68 l $\pm$ 0,92), IC (1,51 l $\pm$ 0,51 / 1,94 l $\pm$ 0,61) y SGAW (0,028 l/cmH2O. seg $\pm$ 0,01 / 0,043 l/cmH2O. seg $\pm$ 0,02), en tanto que disminuyeron significativamente TGV (5,17 l $\pm$ 1,39 / 4,75 l $\pm$ 1,23, $p < 0,01$), RV (4,05 l $\pm$ 1,26 / 3,52 l $\pm$ 1,25, $p < 0,01$), RV/TLC (0,59 $\pm$ 0,1 / 0,5 l $\pm$ 0,11, $p < 0,01$), Pesp (12,3 cmH2O $\pm$ 2,23 / 8,1 cmH2O $\pm$ 1,84, $p < 0,001$) y AP (1,88 cmH2O $\pm$ 1,17 / 0,74 cmH2O $\pm$ 0,8, $p < 0,001$). Relación AP/FVC b, $r = -0,6$, $p < 0,05$, AP/VC (%) b, $r = -0,62$, $p < 0,05$, AP/VC-FVC / FVC b, $r = 0,69$, $p < 0,05$, AP/IC (%) b, $r = -0,63$, $p < 0,05$, AP/RAW b, $r = 0,58$, $p < 0,05$, AP/Pesp b, $r = 0,59$, $p < 0,05$ y AP/TI/TOT b, $r = -0,82$, $p < 0,001$. En el modelo de regresión múltiple solamente quedaron seleccionados el TI/TOT b y la IC (%) b como variables que predicen la AP b ($R^2 = 0,84$). **Conclusiones:** la inhalación de 400 µg de salbutamol produjo un descenso significativo del AP (60% $\pm$ 37) que acompañó a la broncodilatación y disminución del atrapamiento aéreo.

74. Comparación entre gasometría arterial y oximetría de pulso. P Kaplan, G Gorjod, C Gallego, E Rhodius, N Sallis, N Dibur, G DiBartolo, JC Roller, CA Nigro.

Servicio Neumología, Policlínica Bancario, Buenos Aires.

Objetivo: evaluar la sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo (VP) y exactitud de la oximetría de pul-

so en el diagnóstico de hipoxemia. Materiales y métodos: se compararon los resultados de la determinación de la paO_2 (AVL900) y oximetría de pulso (NONIN 8600) tomados en forma simultánea en 141 pacientes ambulatorios adultos de raza blanca. Hipoxemia se definió como una $paO_2 < 60$ mmHg. Una oximetría positiva fue definida como una saturación de O_2 (sat. O_2) $< 90\%$. Resultados: se obtuvieron los siguientes valores: $S = 67\%$, $E = 93\%$, $VP+ = 69\%$, $VP- = 92\%$ y exactitud = 89% . Conclusión: la oximetría de pulso no fue un buen método de catastro para evaluar la presencia de hipoxemia en nuestra población de pacientes dada su alta tasa de falsos negativos.

75. Utilidad de la oximetría de pulso en la detección del síndrome de apneas obstructivas del sueño. CA Nigro, EE Rhodius.

Laboratorio de sueño, Hospital Alemán, Buenos Aires.

Objetivo: valorar la sensibilidad, especificidad y valor predictivo de la oximetría de pulso en el síndrome de apneas obstructivas del adulto (SAO). Materiales y métodos: 25 pacientes con sospecha clínica de SAO fueron estudiados simultáneamente con polisomnografía (PSG) (Polisomnógrafo Akonic/oxímetro Novamatrix 505) y oximetría de pulso (OX) (Novamatrix 520). Los parámetros registrados en la PSG fueron: EEG, EOG, EMG mentón, ECG, flujo aéreo buconasal, movimientos toracoabdominales, ronquidos y oximetría de pulso. La sat. O_2 obtenida con la OX fue depositada en la memoria del equipo cada 8 seg. para su posterior análisis. SAO se definió como un índice de disturbios respiratorios (IDR) mayor de 10 (IDR = N° de apneas/hipopneas/hora de sueño). Se analizaron en forma manual el número de desaturaciones de O_2 /hora de registro (ID) de $\geq 2\%$, $\geq 3\%$ y $\geq 4\%$. Desaturación de O_2 se definió como un descenso de la sat. $O_2 \geq 2\%$ con posterior ascenso de la misma de ≥ 16 seg. de duración. Una oximetría anormal fue definida como un ID ≥ 10 de $\geq 2\%$. La lectura de la PSG y la OX fue realizada en forma doble ciega. Resultados: 22 varones/3 mujeres, edad 52 ± 13 años, índice masa corporal 29.8 ± 6.06 Kg/m², IDR 24.45 ± 22.4 ; 17 tuvieron SAO y 8 no. El tiempo total de registro (TTR) de la PSG y la OX fueron similares (348.83 ± 17.8 min./ 354.26 ± 16.5 min., $p > 0.05$). La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo para un ID ≥ 10 de $\geq 2\%$, $\geq 3\%$ y $\geq 4\%$ fueron: $100\%/62.5\%/85\%/100\%$, $88\%/75\%/88\%/75\%$ y $82\%/87.5\%/93\%/70\%$ respectivamente. Conclusiones: 1) una oximetría normal (ID < 10) realizada en el laboratorio de sueño excluyó la presencia de SAO en nuestra población de pacientes con sospecha de este síndrome 2) un ID ≥ 10 de $\geq 4\%$ tuvo una exactitud diagnóstica para SAO del 84% .

76. Efectos de la hipercapnia sobre la sensación de esfuerzo inspiratorio en normales. De Vito EL; Berizzo EA; Pessolano F; Roncoroni AJ.

Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari, Universidad de Buenos Aires.

Los efectos de la hipercapnia sobre la sensación de esfuerzo inspiratorio (SEI) es tema de controversia. El concepto clásico y dominante respecto que la hipercapnia no tiene efecto sobre la SEI (M. Campbell, 1967) ha sido cuestionado en trabajos recientes (L. Adams, 1985). Objetivo: estudiar los efectos de la hipercapnia sobre la SEI (escala de Borg modificada). Material y Método: 5 normales (25 a 40 años); 3 etapas: 1) ventilación (VE) basal, Borg y PetCO₂; 2) provocación de hipercapnia, con el consiguiente aumento de la VE; 3) copiar la VE en forma isocápnica. Cada etapa fue de 60 segundos. Resultados ($\bar{x} \pm SEM$): VE 1) 12.4 ± 1.1 ; 2) 31.7 ± 2.1 ($p < 0.01$); 3) 28.1 ± 0.6 (NS con 2). PetCO₂: 1) 36.5 ± 1.1 ; 2) 51.7 ± 2.1 ; 3) 36.0 ± 0.57 . Borg: 1) 0.19 ± 0.08 ; 2) 3.40 ± 0.27 ($p < 0.05$); 3) 1.50 ± 0.34 ($p < 0.05$ con 2). Conclusiones: Bajo nuestras condiciones experimentales, la disminución de la PetCO₂ a valores basales, copiando la VE alcanzada en respuesta al estímulo hipercápnico produjo menor sensación de esfuerzo inspiratorio. Estos datos sugieren que el CO₂ tiene un efecto aditivo al que produce el aumento de la VE sobre la SEI.

INMUNOLOGIA I

77. Interacción de la IgG del suero de pacientes con Síndrome de Sjögren Primario (SSP) con receptores muscarínicos de acetilcolina en glándulas lagrimales y salivales. SR Bacman, C Perez-Leirós, R Arana, O Hubscher, L Sterin-Borda, E Borda.

CEFYBO, Cát. Farmacol., Fac. Odontol. UBA, CEMIC. Buenos Aires.

El SSP es una exocrinopatía de naturaleza autoinmune caracterizado por la presencia de xerostomía y conjuntivitis sicca. Dada la regulación colinérgica de las glándulas lagrimal extraorbital (GL) y salival submaxilar (SM), estudiamos si anticuerpos (Acs) del suero de pacientes con SSP podrían alterar dicha regulación. Por ensayos de inmunoblotting sobre membranas de GL y SM, observamos que las IgG (SSP) reconocen una banda cuya movilidad electroforética coincide con los mAChRs. Además, los Acs inhiben en forma dep. de la conc. la unión esp. del ³H-QNB a los mAChRs: ($\bar{X} \pm SEM$): GL: % de unión esp: IgGN(10^{-6} M): 95 ± 5 , IgG SSP: 51 ± 10 ($n=4$); SM: IgGN: 97 ± 6 , IgG SSP: 58 ± 9 ($n=4$). Se estudiaron sistemas de transducción intracelular, midiendo la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS). Los Acs (SSP) activaron a la NOS en forma conc. creciente (pmol/gr tej) ($\bar{X} \pm SEM$): GL: Basal: 873 ± 60 , IgG SSP(10^{-6} M): 1414 ± 102 , IgGN: 905 ± 56 . SM: B: 435 ± 26 , IgG SSP: 620 ± 32 , IgGN: 427 ± 21 ($n=4$) valorándose también la estimulación de la guanilil ciclasa soluble (niveles de GMPc) por RIA (pmol/gr tej): GL: B: 30.4 ± 2.7 , IgG SSP 10^{-6} M: 81.3 ± 5.0 , IgGN: 32.1 ± 3.7 ($n=4$); SM: B: 23.8 ± 1.7 , IgG SSP: 37.2 ± 2.0 , IgGN: 24.1 ± 1.5 ($n=4$). Los efectos fueron bloqueados con atropina 10^{-7} M. Los Acs (SSP) podrían unirse y modificar señales acopladas a los

mAchRs glandulares, sugiriendo una posible participación en la patogenia de este Síndrome.

- 78. El óxido nítrico es un mediador de la apoptosis espontánea de neutrófilos humanos.** NA Riobó, MC Carreras, J Bustamante, A Tovar, A Boveris y JJ Poderoso.

Lab. Metabolismo del Oxígeno. Hospital de Clínicas. Facultad de Medicina. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.

Los neutrófilos son células diferenciadas incapaces de proliferar que mueren por un proceso apoptótico. En condiciones basales, no liberan cantidades detectables de O_2^- y H_2O_2 , pero sin embargo producen $0,07 \pm 0,01$ nmol $\bullet NO$ min $^{-1}$ 10^6 células $^{-1}$. Se evaluó la cinética de apoptosis espontánea según el % de viabilidad, el % de fragmentación de DNA y la fragmentación internucleosomal del DNA a 0, 6, 12 y 24hs. Se observó una leve fragmentación a 6hs, un claro patrón de ladder a las 12hs, intensificado a las 24hs. La incubación con 1mM L-NMMA, inhibidor de la síntesis de $\bullet NO$, suprimió la fragmentación internucleosomal y aumentó la viabilidad a 72hs del 15% al 32%. En el mismo sentido, 50 μg /ml de catalasa inhibieron la apoptosis, posiblemente por la reacción de $\bullet NO$ con su hemo y 50 μg /ml SOD la incrementaron, sugiriendo un aumento en la concentración efectiva de $\bullet NO$ al evitar su reacción con el O_2^- para formar ONOO $^-$. Estos resultados sugieren que el $\bullet NO$ es una señal en el proceso apoptótico espontáneo en los neutrófilos humanos.

- 79. Utilidad de un enzoinmunoanálisis (EIA) de inhibición (I) que permite cofirmar resultados discordantes para anticuerpos anti citoplasma de neutrófilos (ANCA).** A Cardinalli, C Perandones, MC Pizzimenti, R Arana, G Griemberg.

Lab de Reumatología. Inmunología. CEMIC. Lab de Inmunología Clínica. Depto de Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Hosp de Clínicas «José de San Martín». (Universidad de Buenos Aires).

El objetivo de este trabajo es utilizar un EIAI que permita verificar resultados discordantes cuando se obtiene un resultado por inmunofluorescencia indirecta (IFI) para ANCA no reactivo (NR) o imágenes no relacionadas (cANCA, pANCA, aANCA) y el EIA reactivo (R). Los métodos utilizados fueron IFI-ANCA, y EIA (PR3, MPO, HLE) y LF (Sigma). Las muestras evaluadas surgen de un estudio de 111 sueros de pacientes con patologías asociadas a ANCA y 48 sueros de individuos normales. El EIAI está basado en la incubación previa del suero con MPO, luego se realiza un EIA sandwich y se debe verificar una disminución del resultado mayor o igual al 60%, respecto de la misma muestra sin incubación con MPO. En el 98.1% (156/159) se observó asociación entre el tipo de imagen y el antígeno detectado en el EIA. Dos de las muestras presentaron en la IFI imágenes no asociadas a ANCA, la restante NR, pero en

todas ellas se detectó antiMPO R. Los resultados de EIAI fueron > al 80% de I en los tres casos. Las pruebas de I proveen una herramienta confirmatoria en estos casos, adaptable a cualquiera de los antígenos asociados a ANCA, y además este estudio muestra la necesidad de realizar al menos dos pruebas que detecten ANCA para obtener una consistente ayuda diagnóstica.

- 80. Los linfocitos intraepiteliales intestinales se hallan influenciados por antígenos del lumen.** MG Márquez, ME Roux.

Lab. Inmunología Celular, Depto Cs. Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Estudios en nuestro laboratorio en ratas inmunodeficientes por malnutrición han demostrado un aumento significativo en el número de linfocitos intraepiteliales CD8+ en el intestino delgado (LIEi). El objetivo del presente estudio fue discriminar la población LIEi homodimérica (CD8 α/α) de la heterodimérica (CD8 α/b). Ratas Wistar al destete recibieron una dieta libre de proteínas que contiene dextrina durante 15 días y a continuación se les administró por vía oral una dieta con caseína al 20% durante 21 días (E). Controles de la misma edad recibieron una dieta comercial (C). El número de células corresponde al leído en 30 campos por corte de tejido (X $\pm$ ES). El número de LIEi CD8 α/α y CD25+ resultaron significativamente aumentados en E vs C ($61,8 \pm 5,54$ vs $28,60 \pm 1,75$ y $68,20 \pm 4,12$ vs $31,40 \pm 6,45$, $p < 0,001$ respectivamente). No hubo diferencias significativas en el número de LIEi CD8 α/b y en el número de células T CD8 α/b +, CD8 α/b + y CD25+ de la lámina propia intestinal. El aumento significativo de LIEi activados (CD25+: IL-2R+) y de LIEi CD8 α/α + demuestra que la dextrina está actuando como un antígeno luminal. Financiado por FA 057.

- 81. Efecto de la administración oral de timomodulina en un modelo de inmunodeficiencia por déficit proteico severo.** G Pacheco, MG Márquez, M Frontera, NH Slobodianik*, A Florin-Christensen**, ME Roux.

*Lab. Inmunología Celular, Depto Cs. Biológicas, *Depto de Nutrición, Facultad de Farmacia y Bioquímica, **CEMIC, Fac. de Medicina, Universidad de Buenos Aires.*

La administración oral de inmunomoduladores bacterianos (IM-104 y RN-301) durante el período de dieta libre de proteínas demostró repoblación intestinal normal (cél. B y T) con producción local de IgA (Roux y col.). Nuestro objetivo fue investigar el efecto de la administración oral de timomodulina Bago (TmB) durante el período de renutrición proteica 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 (R21TmB) y sin TmB (R21) en el agua. El grupo control (C) recibió dieta comercial. (Resultados: número de células en 30 campos (X $\pm$ ES) en

cortes de intestino en parafina en C vs R21 vs R21TmB, por inmunofluorescencia). La timomodulina incrementa el número de células T CD5+ en la lámina propia ($218,1 \pm 11,6$ vs $179,8 \pm 19,3$ vs $262,4 \pm 8,8$; ANOVA $p < 0,004$) y en el intraepitelio (IE) ($17,6 \pm 0,9$ vs $17,4 \pm 1,0$ vs $29,5 \pm 2,8$, ANOVA $p < 0,004$), y el número de células B IgA+ ($231,0 \pm 19,2$ vs $94,6 \pm 13,2$ vs $278,1 \pm 16,7$; ANOVA $p < 0,004$). La TmB tendría utilidad como agente terapéutico pues favorece la vigilancia inmunológica a nivel epitelial. (Financiado por FA 057)

ENDOCRINOLOGIA II

82. HMG-CoA reductasa en células de Leydig y adrenales de ratas diabéticas. ME Sanchez-Ruiz, MS Kruse, C Zizola, JC Calvo, OP Pignataro.

Instituto de Biología y Medicina Experimental. Buenos Aires.

Trabajos previos han demostrado que en la rata, la diabetes inducida por estreptozotocina (Stz) produce diversas anomalías testiculares que conducen a niveles séricos de testosterona (T) disminuidos. En este trabajo se estudió la actividad de la HMG-CoA reductasa, enzima regulatoria en la síntesis *de novo* del colesterol, en células de Leydig (L) y adrenales (A) de ratas macho adultas controles (C) y diabéticas (D) por tratamiento con Stz (1 dosis, 65 mg/kg peso corporal; 30 días) y se la correlacionó con la síntesis de esteroides. La eficiencia del tratamiento se evaluó mediante la determinación de glucosa plasmática (C: 98 ± 14 ; D: 490 ± 63 mg/100 ml). **Resultados:** En células de Leydig, tanto la producción basal de T como la estimulada por dosis máximas de hCG o dbAMPc estuvo disminuida en las ratas D respecto a las C (B_c : $6,3 \pm 0,2$; B_D : $5,2 \pm 0,1$; hCG_c : 38 ± 2 ; hCG_D : 28 ± 2 ; $dbAMPc_c$: 46 ± 3 ; $dbAMPc_D$: 34 ± 2 ng T/10⁶ cel; $p < 0,05$ en todos los casos), paralelamente a la actividad enzimática (L_c : 50 ± 10 ; L_D : 22 ± 4 pmoles/mg. min; $p < 0,05$). Contrariamente, la actividad enzimática en adrenales de ratas D mostró un aumento respecto a C (A_c : 20 ± 2 ; A_D : 110 ± 15 pmoles/mg min; $p < 0,01$) en concordancia con los niveles de corticosterona circulante (C: $5,9 \pm 1,0$; D: $13,8 \pm 1,5$ ug/100 ml; $p < 0,01$). **Conclusiones:** 1) La HMG-CoA reductasa de testículo y adrenal, se regula en forma diferente, en correlación con el tipo de esteroides producidos; 2) La diabetes inducida por Stz disminuye la esteroidogénesis testicular debido a lesiones a distintos niveles, entre ellas, una inhibición de la enzima regulatoria de la síntesis *de novo* del colesterol.

83. Transporte del colesterol de membrana en la esteroidogénesis inducida por análogos de AMPc y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) en células de Leydig MA-10. OP Pignataro, ME Sanchez-Ruiz, MS Kruse, C Zizola, JC Calvo.

Inst de Biología y Medicina Exptl. Buenos Aires.

El colesterol (Col) es un precursor obligatorio para la síntesis de esteroides y puede provenir de la síntesis *de novo*, de las lipoproteínas plasmáticas o de depósitos de reserva. Se estudió la importancia del transporte del Col. de membrana en la esteroidogénesis inducida por dbAMPc y/o EGF en células MA-10. Se incubaron las células con ³H-Col, se fijaron con glutaraldehído, se oxidó el Col de membrana con Col oxidasa y se determinó Col, colesteno (Cona) y ésteres de Col (est-Col). El EGF estimuló los niveles basales de progesterona (Pg) y potenció los efectos de dosis submáximas de dbAMPc (C: $3,1 \pm 0,2$; EGF: 16 ± 2 ; dbAMPc, 0,1 mM: 80 ± 9 ; EGF+ dbAMPc, 0,1 mM: 1030 ± 87 ; dbAMPc, 1 mM: 1420 ± 90 ng Pg/10⁶ cel). La producción de esteroides fue comparada con la internalización y utilización del Col de membrana (determinado por Cona) y de los est-Col en 4h de tratamiento. Sólo los efectos potenciadores del EGF sobre la síntesis de Pg provocaron utilización del Col de membrana y de los est-Col, de la misma forma que dosis máximas de dbAMPc (Cona: C: $31,4 \pm 1,8$; EGF: $27,9 \pm 1,2$; dbAMPc, 0,1 mM: $26,0 \pm 2,5$; EGF+ dbAMPc, 0,1 mM: $18,2 \pm 2,0$; dbAMPc, 1 mM: $16,5 \pm 1,7$ cpm/10⁶ cel x 10⁻³; est-Col: C: $13,5 \pm 1,2$; EGF: $13,2 \pm 0,4$; dbAMPc, 0,1 mM: $11,0 \pm 0,5$; EGF+ dbAMPc, 0,1 mM: $6,0 \pm 1,5$; dbAMPc, 1 mM: $4,1 \pm 0,3$ cpm/10⁶ cel x 10⁻³). **Conclusiones:** En las células MA-10, la internalización del colesterol de membrana es una consecuencia de la esteroidogénesis aumentada cuando el requerimiento excede las reservas endógenas.

84. Respuesta aguda al estímulo con hCG de los precursores de células de Leydig humanas en cultivo. E Pellizzari, S Meroni, H Chemes, S Cigorraga.

CEDIE. Hospital de Niños «R. Gutiérrez». Buenos Aires.

Hemos demostrado anteriormente que en el testículo prepuberal humano existe una población celular que es capaz de producir testosterona e iniciar en cultivo el proceso de diferenciación hacia células de Leydig en respuesta al estímulo prolongado con gonadotrofinas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de respuesta aguda a la gonadotrofina de estos precursores de células de Leydig. En el momento de máxima producción de esteroides (días 9 a 11 en cultivo), se determinó por RIA la testosterona producida en tres horas de incubación en condiciones basales (B) o bajo estímulo con hCG (50 ng/ml hCG Cr127). Los resultados obtenidos expresados como ng T/ µg ADN/ 3 hs ($X \pm DS$, $n=3$) fueron: B: $1,5 \pm 0,3$; hCG: $1,7 \pm 0,1$. La producción de testosterona en incubaciones por tres horas con toxina colérica (TC, 50ng/ml), forskolina (FK, 2,5 µM), dibutilil AMP cíclico (dbAMPc, 0,1mM) y hCG (50ng/ml) en presencia de metil isobutil xantina (0,125 mM) (hCG+MIX) expresada como veces de incremento con respecto a la producción Basal fue: TC: 2,8; FK: 4,2; dbAMPc: 3,6 y hCG+MIX: 3,3. Se evaluó asimismo la producción de testosterona en incubaciones con concentraciones crecientes de 22 (R) hidroxicolessterol,

obteniéndose los siguientes resultados: B: $1,5 \pm 0,2$; 0,1 μM : $3,5 \pm 0,5$; 1 μM : $5,7 \pm 0,6$; 5 μM : $12,1 \pm 0,9$ (ng T/ μg ADN/ 3 hs, $X \pm \text{DS}$, $n=3$). En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que la falta de respuesta aguda a la hCG de los precursores de células de Leydig no se debe a la ausencia de enzimas esteroidogénicas sino probablemente a deficiencias en pasos previos a la ruptura de la cadena lateral del colesterol.

85. Correlación entre potencial esteroidogénico y diferenciación citológica en precursores inmaduros de células de Leydig. M Musse, E Pellizzari, M Venara, M Dym, S Cigorraga, H Chemes.

CEDIE, Hospital de Niños R Gutiérrez, Buenos Aires.

El Etilen-dimetan-sulfonato (EDS) induce una necrosis de las células de Leydig (CL) testiculares, seguida por la diferenciación de una nueva generación de CL a partir de sus precursores inmaduros (PI). Hemos aislado y purificado una fracción altamente enriquecida en PI (95-99%) de ratas adultas 30 dRas post-EDS, y comparado su respuesta con una fracción purificada de CL de ratas controles de la misma edad. La producción de testosterona (T) medida por RIA en condiciones basales y bajo estímulo con concentraciones crecientes de hCG (0 - 0,005 - 0,01 - 0,05 - 0,1, y 5 ng/ml) fue en CL: 24 ± 9 , 26 ± 1 , 25 ± 2 , 64 ± 4 , 128 ± 17 , 253 ± 27 , y en PI: 12 ± 3 , 9 ± 5 , 9 ± 4 , 15 ± 3 , 30 ± 6 , 76 ± 1 , respectivamente ($X \pm \text{DS}$, $n=3$, ng/106 cel/3h). Los resultados muestran una disminución en la sensibilidad y en la respuesta máxima al estímulo con hCG de la fracción de precursores inmaduros, en comparación con la fracción de CL purificadas de animales normales. Se localizaron por inmunohistoquímica receptores de hCG (R-hCG), 38-hidroxiesteroide deshidrogenasa (38HSD), P450scc y T, los que resultaron positivos en los precursores, con intensidad variable dependiendo del grado de diferenciación citológica de los mismos. En conjunto los resultados indican que los precursores inmaduros están provistos de R-hCG y enzimas esteroidogénicas y son capaces de responder a la estimulación con hCG con niveles crecientes de secreción de testosterona. Sin embargo, sus características citológicas y las diferencias de su respuesta a la hCG con la de las CL de animales controles indican que aún no han completado su diferenciación citológica y funcional.

86. Efecto del GABA sobre la producción de andrógenos en células intersticiales testiculares del hamster dorado. MB Alloatti, LB Pregliasco, DE Bas, RE Rosenstein*, MN Ritta.

*Instituto de Biología y Medicina Experimental *Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA, Buenos Aires.*

En trabajos previos hemos demostrado la presencia del ácido γ -aminobutírico (GABA) en diversos tejidos del tracto genital masculino del hamster dorado: testículo, epidídimo, vesícula seminal y próstata. El objetivo del presente trabajo fue examinar la participación GABAér-

gica en el control de la esteroidogénesis. A tal fin, se examinó el efecto del GABA sobre la producción *in vitro* de testosterona en una suspensión de células intersticiales testiculares en presencia de MIX. El GABA, de manera dependiente de la concentración (10^{-8} - 10^{-5} M), aumentó significativamente la producción de andrógenos (control: $1,27 \pm 0,05$, GABA 10 μM : $1,55 \pm 0,05$ ng/10 6 cel., $p < 0,001$). El efecto del GABA fue bloqueado por bicuculina (antagonista GABAérgico de tipo A) y por picrotoxina (bloqueante del canal de cloruro). El efecto del GABA sobre la producción de andrógenos resultó disminuido en ausencia de MIX. En este sentido, se demostró que el GABA incrementó significativamente la acumulación de AMPc en células intersticiales (control: $3 \pm 0,07$, GABA: $3,45 \pm 0,06$ pmol/10 6 cel., $p < 0,001$). Por otra parte, se demostró que el aminoácido induce un incremento en los niveles de Ca^{2+} intracelular determinado por espectrofluorometría con Fura-2. En un medio libre de Ca^{2+} extracelular, el efecto del GABA sobre la acumulación de AMPc fue suprimido, en tanto que su efecto sobre la producción de andrógenos fue inhibido. En suma, estos resultados sugieren la participación del GABA en el control de la esteroidogénesis y señalan al AMPc y al Ca^{2+} intracelular como posibles mensajeros intracelulares de la acción GABAérgica.

87. Efecto glucocorticoide de derivados de Progesterona: apoptosis en timo y endometrio. G Vicent, A Pecci*, A Ghini, G Burton y C P Lantos.

*Dtos de Qca Biológica y Orgánica, PRHOM-CONICET. FCEyN Universidad de Buenos Aires. *Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) Marburg, Alemania.*

La apoptosis es inducida en respuesta a señales tejido-específicas. Los glucocorticoides (Gc) inducen apoptosis en timo y la inhiben en endometrio. En timo de ratas adrenoprivas, 5mg/kg de derivados de progesterona (P) como 11 β -hidroxip (HOP) y Delta-1-HOP (DHOP), inducen la degradación de ADN (densitometría de bandas <2Kb en escalera: Dexametasona (DX) 1; HOP 0,15; DHOP 0,4). En una línea celular de endometrio de rata que expresa el receptor de Gc (RENTRO I), HOP y DHOP inducen la expresión de la enzima cloramfenicol acetiltransferasa (CAT) (gen reporter GRE2-TK-CAT). Ambos derivados inducen la expresión de CAT en forma dosis dependiente; los % de conversión del cloramfenicol a su forma acetilada (Gaiddon et al Endocrinology, 137, 1286, 1996) son: $5,5 \pm 0,3$ y $4,2 \pm 0,2$ para 1 mM HOP y DHOP respectivamente y $0,5 \pm 0,02$ para etanol. HOP y DHOP mantienen la viabilidad de células RENTRO I hasta las 36 hs en medio inductor de apoptosis (sin suero). Los % de viabilidad respecto al tiempo 0 son: $88,4 \pm 5,2$ (HOP) y $85,6 \pm 4,3$ (DHOP). Sin embargo, en RENTRO I la apoptosis no es inhibida por estos esteroides (13 y 16 %). Estos resultados sugieren que en células de endometrio, HOP y DHOP tendrían un efecto mitogénico también propio de los Gc, más que inhibitorio de apoptosis.

88. **Función esteroidogénica de adrenal de vizcacha: efecto del litio.** LB Matkovic, DG Romero y EN Cozza.

Dto de Qca. Biológica, FCEyN, UBA, Buenos Aires. y PRHOM (CONICET). y G Orellano, M Bruno y JA Guzmán. Cátedra de Farmacología, FQByF, UNSL, San Luis.

El tratamiento con litio altera la histoarquitectura de la adrenal de vizcacha, pero no provoca cambios en el modelo más común: la rata; por lo que se estudió cuáles son los cambios en el metabolismo esteroidogénico adrenal producidos por este compuesto. Vizcachas machos fueron tratados con vehículo o 1 meq/kg.día de Li^+ por 30 días. Se extrajeron sangre y glándulas adrenales. Se determinaron mediante radioinmunoensayo niveles séricos y endógenos adrenales de corticosterona (B) y de aldosterona (ALDO) y, la conversión de DOC a ALDO. Los niveles séricos (pg/ml) de B fueron: Controles (C): 1855 ± 135 y Tratados (T): 1575 ± 160 (NS, $p > 0,2$, $n = 4$); y de ALDO fueron: C: $14,35 \pm 1,12$ y T: $48,2 \pm 4,6$ ($p < 0,001$, $n = 4$). Los niveles endógenos adrenales de B fueron: C: $3,73 \pm 0,34$ y T: $3,95 \pm 0,24$ mg B/g adrenal (NS, $p > 0,2$, $n = 4$); y de ALDO fueron C: $15,64 \pm 1,90$ y T: $34,32 \pm 4,02$ ng ALDO/g adrenal ($p < 0,001$, $n = 4$). La conversión de DOC a ALDO fue C: $32,66 \pm 4,28$ y T: $50,33 \pm 3,48$ pg ALDO/mg proteína.min ($p < 0,02$, $n = 4$). El Li^+ produce aumento en los niveles de ALDO lo cual sería debido a un aumento en la actividad de la enzima CYP11B2 (DOC $\rightarrow$ ALDO). El Li^+ , ampliamente utilizado como antidepresivo en seres humanos, produciría efectos colaterales en vizcacha similares a los que se podrían hallar en tratamientos crónicos en humanos.

89. **Osmolalidad de los plasmas seminales.** AM Caille*, R Smith**, E Bustos Obregón**.

**Fac. Cs. Bioq. y Farmac. Area Biol., UNR, Ros. #IDIMI, Fac. de Medic., U. de Chile. **Dpto de Biol. Cel. y Genét., Fac. Medic., U. de Chile.*

La osmolalidad (O) es una variable relacionada con la composición del medio y modula el intercambio de moléculas e iones a través de la membrana plasmática. Se estudió la O de los plasmas seminales (PS) de pacientes (Pa) con distintas características seminales. La O fue evaluada mediante el punto de congelamiento de los PS en Pa fértiles (F, $n=11$), normozoospermicos (N, $n=20$) y astenozoospermicos (A, $n=20$) (criterio OMS). Los resultados se expresan en mOsm/kgH₂O. La O de los PS del grupo F varió entre 326 y 486 (413 ± 14). Para el grupo N varió entre 382 y 560 (480 ± 12), y para el grupo A entre 412 y 616 (492 ± 11). Los PS de F presentaron una O media menor ($p < 0,01$) que los grupos N y A. Un 45% de los Su N y A presentaron PS con valores de O superiores a 490. Un gran porcentaje de Pa con características N y A presentan PS marcadamente hiperosmolales (> 490). Esto sugeriría que la O podría participar en la variabilidad de la función espermática en estos Pa.

90. **Capacitación y estabilidad de la cromatina.** AM Caille*, R Smith**, E Bustos Obregón**.

**Fac. Cs. Bioq. y Farm. Area Biol., UNR, Ros. #IDIMI, Fac. Med., U. de Chile. **Dpto. Biol. Cel. y Genét., Fac. Med., U. de Chile.*

La estabilidad de la cromatina espermática (ECE), adquirida durante la maduración epididimaria, refleja la madurez del espermatozoide (E). Se evaluó el efecto de la capacitación (Ca) sobre la ECE. Se estudiaron sémenes (S) de donantes fértiles (F, $n=11$), normozoospermicos (N, $n=20$) y astenozoospermicos (A, $n=20$) (criterio OMS). Se utilizó Tyrode modificado (BSA: 5mg/ml) para la Ca. La ECE se evaluó usando un detergente aniónico (SDS 1% en buffer borato) en los S y post Ca, siendo los E estables: GI y los muy inestables: GIII. Se estableció el valor umbral normal (VN) para F GI 30% y GIII < 20%. GI en S y post Ca fueron semejantes en cada grupo. En F, GI fue mayor ($p < 0,005$) que en N y A en los S y post Ca (S: 45 ± 3 vs 33 ± 3 en N y 32 ± 3 en A, Ca: 53 ± 4 vs 38 ± 2 en N y 39 ± 3 en A). Todos los F presentan GI 30% en S y post Ca, la mitad de los N y A presentan S fuera del VN (GI: 15 a 25 para N y 17 a 29% para A). La Ca aumenta la ECE en N y A. La remoción del plasma seminal (PS) y Ca de los E aumenta la ECE en Pa con ECE inferior al VN. El PS de Pa con estas características alteraría la ECE.

91. **Efectos de diazepam sobre la actividad funcional de espermatozoides epididimarios de ratón.** G Stutz, RD Ruiz, M Fiol de Cuneo, L Vincenti, A Ponce, ME Santillán y JL Lacuara.

Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Con el propósito de aportar datos relativos a los efectos de ciertas drogas sobre la motilidad, vitalidad, resistencia al shock hipoosmótico, reacción acrosomal, índice de fertilización in vitro y clivaje embrionario de espermatozoides epididimarios de ratón, se administró Diazepam (1mg/Kg/dRa, i.p.) a machos adultos durante 35(A) ó 60(B) días y a hembras desde el día 5 al 16 de gestación (las crías machos fueron sacrificadas en la adultez, D). Los grupos controles (C) recibieron vehículo exclusivamente. En A, el porcentaje de gametas móviles disminuyó significativamente con respecto a C ($42,0 \pm 3,0$, $n=10$ y $59,3 \pm 4,5$, $n=11$ respectivamente, $p < 0,05$). En B no se detectaron diferencias significativas. En D, se observó un descenso significativo en el porcentaje de gametas progresivas con el incremento concomitante de no progresivos e inmóviles. La tendencia de la droga es deprimir la motilidad cuando se administra en la adultez o en el período prenatal. No se detectaron modificaciones significativas en los otros parámetros estudiados. Los resultados del grupo B sugieren el posible desarrollo de tolerancia. Trabajo subsidiado por la Fundación «A.J. Roenimmers» e incluido en el PRIDRAH-CONICET.

- 92. Efectos del estrés crónico sobre niveles de corticosterona y actividad funcional de espermatozoides epididimarios de ratas.** M Suárez, M Fiol de Cuneo, L Vincenti y RD Ruiz.

Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Se han descrito efectos adversos del estrés sobre la función reproductora masculina. En el presente trabajo se utilizaron ratas Wistar (8 semanas) sometidas a estrés por inmovilización (A: 12 dRas) o estrés aleatorio (B: 24 dRas; C: 32 dRas y D: 32 dRas más 28 días de reposo). Los niveles de corticosterona plasmática no se modificaron en A y D y se incrementaron significativamente en B y C con respecto al control ($p < 0,05$). Los valores de corticosterona adrenal fueron similares en todos los grupos. El peso corporal y testicular disminuyó sólo en C y D. En el grupo C el porcentaje de espermatozoides vivos decayó de $58,2 \pm 3,0$ ($n = 6$) a $46,0 \pm 3,3$ ($n = 8$, $p < 0,05$) y en el grupo D, el porcentaje de gametas progresivas disminuyó de $61,9 \pm 4,2$ ($n = 7$) a $43,8 \pm 4,8$ ($n = 7$, $p < 0,05$). No se detectaron modificaciones en estos parámetros en los otros grupos. La respuesta al shock hipoosmótico no varió en ninguna de las condiciones experimentales. Los resultados sugieren que un incremento sostenido en la actividad del eje hipotálamo-hipofiso-corticoadrenal puede modificar la actividad del eje hipotálamo-hipofiso-testicular. *Trabajo incluido en el Programa de Investigación y Docencia en Reproducción Animal y Humana (PRIDRAH-CONICET).*

- 93. Variaciones en el aporte dietético de ácidos grasos esenciales (AGE) y actividad funcional espermática.** ME Santillán, M Fiol de Cuneo, RD Ruiz, L Vincenti, G Stutz, A Ponce y JL Lacuara.

Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

La composición lipídica de la membrana espermática tiene relevancia estructural y funcional. Investigamos en espermatozoides de epidídimo caudal de ratón los efectos de variaciones dietéticas (2 a 5 meses) sobre la motilidad, vitalidad, respuesta al shock hipoosmótico, reacción acrosomal (RA) e índice de fertilización in vitro (FIV) ó in vivo mediante coito natural (FIVO). Las dietas fueron: comercial (COM), carente de: AGE (CAGE), linoleico (CAL) ó alinolénico (CALN). Ocurrió disminución significativa en el FIV: en CALN a los 2 meses ($p < 0,05$) y en CAGE a los 3 meses ($p < 0,001$) con respecto a los otros grupos; a los 4 meses, COM fue significativamente superior a los grupos restantes ($p < 0,001$). A los 5, CAL alcanzó porcentajes significativamente inferiores a los otros grupos, detectándose además una FIVO de 0%. Se observó además en este grupo un aumento significativo en RA a los 4 y 5 meses. No se encontraron cambios significativos en los otros parámetros investigados. Los resultados indican que las modificaciones dietéticas empleadas alteran fundamentalmente los procesos de fusión y fertilización. *Trabajo subsidiado por la SECYT-UNC e incluido en el PRIDRAH-CONICET.*

- 94. Efecto central de adrenalina sobre progesterona (P) ovárica en rata. Relación con LH.** M De Bortoli, M Garraza, G Jofré, L Aguado.

Lab. Biol. de la Reproducción Univ. Nac. San Luis, San Luis.

Distintos lotes de 6 ratas hembras Holtzman c/u, fueron canulados en ventrículo lateral derecho. Al primer diestro 2 se inyectó ICV: vehículo, o adrenalina (Ad) $0,5 \mu\text{g}$ ó $5 \mu\text{g}$. Se extrajo sangre de vena ovárica izquierda cada 1 min (*) hasta 25' post inyección y se dosó P (ng/ml). Con vehículo y nervio ovárico superior (NOS) intacto, $P_{\text{basal}} = 37,5 \pm 4,2$; si se secciona NOS izquierdo (NOSs), $P = 35 \pm 3,9$; en ambos casos P no varió en 25' (los siguientes P se comparan vs estos valores). Con $0,5 \mu\text{g}$ Ad ICV, P baja entre 2' y 11' ($p < 0,01$). Seccionando el NOS 2' antes de $0,5 \mu\text{g}$ Ad ICV el efecto es menor: P baja entre 2' y 7' ($p < 0,05$). Con $5 \mu\text{g}$ Ad ICV (NOS intacto) el efecto es mayor y más largo (1 y 25' $p < 0,05$; de 2 a 19 $p < 0,01$). En otros lotes se extrajo sangre de yugular antes y 3, 10, 17 y 25' post ICV dosándose LH. Con $0,5 \mu\text{g}$ Ad ICV, LH no varió en 25' ($LH_{\text{basal}} = 0,56 \pm 0,18$ ng/ml). Con $5 \mu\text{g}$ Ad ICV aumentó LH ($p < 0,05$ vs basal). En otro esquema se extraen ovarios izquierdos 5' post $5 \mu\text{g}$ Ad ICV, y se incuban en Krebs Ringer glucosa = $0,1 \text{mg/ml}$, albúmina = $0,1 \text{mg/ml}$, con 50 ng LH/ml , a 37°C en baño metabólico. Se dosó P en líquido de incubación. P liberada es menor ($p < 0,05$) a los 30, 60, 120 y 180' en ratas inyectadas ICV que con vehículo, donde $P_{30'} = 1,37 \text{ ng/ml} \pm 0,45$; $60' = 2,35 \pm 0,74$; $120' = 3,66 \pm 1,1$; $180' = 4,71 \pm 1,2$. *Conclusiones:* Ad ICV disminuye P ovárica aún con LH aumentada. El NOS conduciría gran parte de ese efecto. Habría una competencia entre el efecto neural y endocrino sobre la P ovárica primando el neural.

- 95. Efecto adrenérgico en ventrículo lateral cerebral sobre progesterona (P) en vena ovárica de rata. Caracterización.** M De Bortoli, M Garraza, L Villegas, L Aguado.

Laboratorio Biología de la Reproducción. Univ. Nac. de San Luis. San Luis.

Se encontró que adrenalina ICV disminuye P en vena ovárica, y aquí se intenta caracterizar ese efecto. Se trabajó con 6 lotes (L) de 6 ratas hembras Holtzman c/u. A todas se canuló ventrículo lateral cerebral derecho. Al primer diestro 2 a los L 3 y 5 se les seccionó el NOS, los restantes lotes tuvieron operación simulada (sham). A 2 min (*) se inyectó ICV $5 \mu\text{l}$ con: vehículo (ac. ascórbico $10 \text{ mg}\%$) al L1; $5 \mu\text{g}$ de un agonista β adrenérgico Isoproterenol (Isop) al L2 y 3; $5 \mu\text{g}$ de un antagonista β adrenérgico Propranolol (Prop) al L4 y 5; y $5 \mu\text{g}$ de un agonista α 1adrenérgico Fenilefrina (Fen) al L6. Se extrajo sangre de vena ovárica izquierda cada 1' hasta 25' post inyección ICV y se dosó P. En L1 -control- P basal = $37,5 \pm 4,2 \text{ ng/ml}$ y no varió hasta 25' (las siguientes P se comparan a L1). En L2 con Isop disminuyó P ($p < 0,05$) desde 1 hasta 25'. En L3 con Isop la P no varió en 25'.

En L4 con Prop aumentó P ($p < 0,05$) a los 2, 3 y 4'. En L5 con Prop la P no varió en 25'. En L6 con Fen no varió P en 25'. **Conclusiones:** el efecto de Isop, y el contrario de Prop indicarían que el efecto central sobre la P ovárica tiene características de badrenérgico. La ausencia de efecto con el agonista $\alpha 1$ Fen confirmaría la suposición anterior. La diferencia entre los lotes sham y NOS seccionados confirma que el efecto encontrado se conduce -al menos principalmente- vía NOS.

96. Efecto de la estimulación in vitro del ganglio celíaco sobre la función luteal en la preñez. M Casais, L Villegas, A Rastrilla, L Aguado.

Laboratorio de Biología de la Reproducción. UNSL San Luis.

El ovario está controlado por el sistema endocrino y neural. Las fibras del nervio ovárico superior (NOS) provienen del ganglio celíaco (GC) e inervan las células tecointersticiales del ovario. La sección del NOS en forma aguda (48hs antes) en ratas de 15 días de preñez produjo un aumento ($P < 0,001$) en la liberación de progesterona en cultivo de células luteales. Se desarrolló un esquema experimental GC-NOS-OVARIO integrado in vitro. El sistema se incubó en solución Krebs Ringer glucosa (0,1 mg/ml) albúmina (0,1 mg/ml), a 37°C en baño metabólico, ocupando el ganglio y el ovario celdas separadas unidos por el NOS. El efecto ganglionar se estudió en presencia de noradrenalina (NA), propranolol (Prop) o fentolamina (Fa) en concentración 10⁻⁷ M en ácido ascórbico respecto a controles con vehículo solamente y se determinó la progesterona liberada por el ovario a los 30', 60', 120', 180'. Los resultados indican que NA produce un aumento ($P < 0,001$) en la liberación de progesterona, Prop un aumento ($P < 0,05$), mientras que Fa una disminución ($P < 0,001$). Resultados preliminares indicarían que la adición de LH al compartimiento ovárico no modificaría el efecto de Fa ni tendría efecto propio en la liberación de progesterona. Se concluye que el efecto estimulador sería de naturaleza β adrenérgica, mientras que el efecto inhibitorio sería α a diferencia de lo que ocurre en el cuerpo lúteo del ciclo estral.

97. Control hormonal de las modificaciones del cérvix uterino de la rata durante el parto. JG Ramos, H Rodríguez, M Maffini, M Bassani, M Muñoz de Toro, EH Luque.

Lab. de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL, Santa Fe.

Una correcta dilatación del cérvix uterino es necesaria para evitar el daño fetal durante el parto. En el cérvix de la rata intraparto ocurre una marcada infiltración de eosinófilos asociada con una extensa colagenólisis. Nuestro objetivo fue estudiar el papel de la relaxina (Rlx) y el 17 β -estradiol (E_2) sobre los fenómenos mencionados. Se usaron ratas preñadas intactas y ovariectomizadas (OVX) el día 22 de preñez (D22), sacrificadas intraparto (D23). Desde la OVX los animales recibieron vehículo, Rlx, E_2 o Rlx+ E_2 (simulando las concentraciones fisiológicas del final de la preñez).

La infiltración de eosinófilos se cuantificó usando la tinción de Sirius alcalino y se expresó como densidad de volumen (Vv). La colagenólisis se cuantificó por el método de Picrosirius-Polarización. La infiltración leucocitaria en los grupos con E_2 (Vv 5,8) y E_2 +Rlx (Vv 6,7) fue semejante a los controles preñados intactos (Vv 6,1). Por el contrario, el grupo tratado sólo con Rlx presentó una baja infiltración (Vv 0,1; $p < 0,05$) semejante a los controles preñados OVX+veh (Vv 0,63). Los animales tratados con E_2 no presentaron colagenólisis mientras que los inyectados con Rlx o Rlx+ E_2 mostraron una extensa degradación del colágeno similar a los controles intactos intraparto. En los grupos sin colagenólisis (OVX+veh y OVX+ E_2) el momento del parto se atrasó 10 h y las crías presentaron signos de traumatismo obstétrico. Concluimos que, si bien la infiltración leucocitaria y la colagenólisis son eventos asociados temporalmente, hay una disociación en el control endócrino de ambos procesos. Mientras que el E_2 promovería la infiltración de eosinófilos, la colagenólisis sería regulada por los niveles de Rlx.

98. Mecanismo de acción de la progesterona y los estrógenos sobre la infiltración leucocitaria en el útero de la rata pseudopreñada. JG Ramos, M Maffini, M Bassani, M Muñoz de Toro, EH Luque.

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL, Santa Fe.

Previamente demostramos que la progesterona (P) y el 17 β -estradiol (E_2) regulan la infiltración de eosinófilos en el cérvix de la rata intraparto. El objetivo del presente trabajo es conocer los mecanismos a través de los cuales ambos esteroides modulan esta infiltración leucocitaria. Ratas pseudopreñadas se ovariectomizaron (OVX) el día 9 (D9). Desde la OVX diferentes grupos recibieron P, E_2 , P+ E_2 , en dosis que simulan las concentraciones fisiológicas de la preñez, otros grupos recibieron -además- un antagonista estrogénico (Tamoxifeno Tx), o un antagonista progestágeno (RU-486). Biopsias de cérvix y cuernos uterinos fueron obtenidas el D23, teñidas con Sirius alcalino para cuantificar la infiltración de eosinófilos (expresada como densidad de volumen Vv). Los animales tratados con E_2 presentaron altos niveles de infiltración tanto en cérvix (Vv 4,06) como en útero (Vv 4,6), el Tx bloqueó el efecto de los E_2 en ambas regiones (Vv 1,25; $p < 0,05$). Las hembras tratadas con P o P+ E_2 no presentaron infiltración (cérvix: Vv 0,49, cuernos: Vv 0,003); sin embargo cuando al grupo de P+ E_2 se les inyectó RU-486 la infiltración aumentó (Vv 5,6), siendo comparable al grupo tratado con E_2 (Vv 4,06). Si bien los porcentajes de inhibición y/o estimulación no fueron iguales en el cérvix y en cuernos uterinos, ambas zonas respondieron de manera equivalente al tratamiento hormonal. Los resultados permiten concluir que el efecto infiltratorio del E_2 estaría mediado por el receptor de E_2 y que la P ejercería un efecto inhibitorio que es bloqueado por el RU-486.

TUMORES II

99. Los isoprenoides controlan la proliferación celular. MB Ortiz, A Baldi.

Instituto de Biología y Medicina Experimental. Obligado 2490, 1428 Buenos Aires.

El ácido mevalónico, intermediario clave en la síntesis de colesterol, se requiere para la acción mitogénica de EGF, prostaglandinas, bombesina y PDGF en la línea murina Swiss 3T3. Dichas células fueron sometidas a la acción de derivados del colesterol con el objeto de estudiar sus efectos a nivel de la proliferación celular, mediante la incorporación de timidina tritiada en ADN, detectada por autoradiografía. Hemos demostrado, que dos derivados metabólicos, farnesol y geranilgeraniol ambos empleados a 10 mM, participan de diversa manera en procesos mitogénicos. Mientras que el farnesol solo o conjuntamente no afectó el índice mitogénico, el geranilgeraniol, fue capaz en combinación con mitógenos, de elevar los índices de núcleos marcados de 15%, 12%, 45% y 20% hasta 30%, 25%, 80 % y 50 % para EGF, PDGF, bombesina y PGF2 α respectivamente. Sin embargo, dicho isoprenoide agregado aisladamente resultó ineficaz. Los efectos fueron dependientes de la concentración (5-20 mM), siendo citotóxico en niveles superiores a 40 μ M. Este isoprenoide ejerció su máxima potenciación durante la fase G1 temprana. Estos resultados demuestran que el geranilgeraniol actuaría potenciando el efecto de un número de factores mitogénicos que utilizan diferentes caminos de transducción de señales.

100. Efecto de la Doxorubicina sobre la eficacia terapéutica de la TFD basada en ALA. A Casas, H Fukuda y A Batlle.

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP) FCE y N, Universidad de Buenos Aires y CONICET

Continuando con los estudios de combinación de TFD basado en ALA y antineoplásicos, utilizando nuestro modelo *in vitro-in vivo* (SAIC 93) investigamos el efecto de la administración previa de DOX. Ratones portadores de adenocarcinoma mamario M2, se inyectaron por vía i.p. con una única dosis de 5 mg/kg o 30 mg/kg DOX. Luego de 16 y 40 hs de la administración de la droga, se midieron los niveles de porfirinas, las actividades de algunas de las enzimas del camino del hemo, y la formación de MDA como índice de peroxidación lipídica. Se prepararon además explantes tisulares de tumor, los que fueron incubados con ALA 0.6mM por 2 hs. Al cabo de ese tiempo, unos fueron irradiados 15 min y otros no, con un láser de baja potencia (3,5 mW, 630 nm). También se prepararon controles incubados en ausencia de ALA. Luego de la irradiación, los explantes se inocularon s.c. en animales receptores normales, en el flanco derecho los explantes irradiados y en el izquierdo, los no irradiados, y se siguió la evolución de los tumores durante 25 días. Encontramos que la dosis de

DOX de 5 mg/kg, no afectó la biosíntesis de porfirinas ni los niveles basales de MDA en los tejidos analizados: tumor, hígado y corazón. Pero cuando los explantes se incubaron con ALA y por lo tanto acumularon porfirinas, la LPO en tumor aumentó significativamente (300% con respecto al control sin tratar), sin cambios en la LPO de corazón. En esas condiciones, la DOX potenció en un 30% el efecto antitumoral de la TFD basada en ALA. Por lo tanto esta combinación de terapias, con esta secuencia de administración y dosis, sería beneficiosa para el tratamiento de tumores.

101. Determinación simultánea del índice de proliferación (IP) y sensibilidad a drogas (SD) en tumores de cerebro humano. V Idoyaga Vargas, M Cruz, JS Yakisich, J Boetius y S Ake.

IIB Fund. Campomar, IBC Fac. Med. Universidad de Buenos Aires, Karolinska Institutet, Sweden, (presentado por E. del Castillo).

Hemos determinado el IP de tejido cerebral periférico a tumores (Brain Around Tumor) y de tumores primarios de cerebro humano mediante un nuevo, rápido y sencillo ensayo (el proceso completo se realiza en $\approx$ 6 Hs). El tejido tumoral proveniente de pacientes portadores de tumores de cerebro obtenido por craneotomía se procesa en el quirófano para obtener fragmentos de $\approx$ 100-200mm de diámetro (Mini-Unidades de Tejido Tumoral). Las MUTT son incubadas durante 90-120 minutos con metil- 3 H-timidina en presencia y ausencia de drogas capaces de inhibir la proliferación celular. El IP y la SD se determinan simultáneamente mediante la incorporación de metil- 3 H-timidina a ADN/mg de proteínas/minuto. El IP (cpm/mg de proteínas/minuto) de estos tejidos fue el siguiente: BAT (n=4) $0,37 \pm 0,16$; astrocitoma (n=8) $0,88 \pm 0,25$ y glioblastoma (n=4) $1,1 \pm 0,26$. Además hemos detectado que la staurosporina (un inhibidor inespecífico de proteínas kinasas) en concentraciones de 100nM disminuye el IP de los astrocitomas hasta un 60 %. Este ensayo, debido a que en la actualidad no existen métodos con estas características, podría ser de utilidad en la determinación de la SD de las células neoplásicas en forma rutinaria para la selección racional de drogas antineoplásicas en el tratamiento de pacientes portadores de tumores de cerebro y de otros tumores sólidos.

102. Citotoxicidad aditiva del anticuerpo monoclonal (AMC) FC-2.15 y adriamicina (Adr) o taxol contra células de carcinoma de mama. C Ballarín, P Portela, J Schiaffini, R Yomha y J Mordoh -

I I B "Fundación Campomar", Htal. Rivadavia, Buenos Aires.

FC-2.15 presenta una potente citotoxicidad mediada por complemento humano (CMC) contra células aisladas de carcinoma mamario humano y células MCF-7. Este AMC indujo respuestas objetivas en pacientes con cáncer. En este trabajo se investigó si el antígeno 2.15 se

expresa en células de cáncer mamario con resistencia múltiple a drogas y si FC-2.15 es activo contra éstas. Se ensayó también el efecto combinado de ADR o taxol y FC-2.15, en células MCF-7 (wt) y una variante de éstas ADR-resistentes (ADR^R). Experimentos de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia demostraron que tanto células MCF-7 ADR^R como muestras tumorales provenientes de 9 pacientes con cáncer de mama no respondedores a quimioterapia, presentaron el antígeno 2.15. Células MCF-7 wt y ADR^R, se cultivaron con ADR o taxol y luego con FC-2.15 y complemento. FC-2.15 indujo similar CMC contra ambas líneas celulares, alcanzándose un máximo a 25 µg/ml, cuando la población celular disminuyó a $21.1 \pm 2.3\%$ y $27.9 \pm 4.0\%$ para wt y ADR^R respectivamente. Cuando el efecto de ADR fue evaluado, ID₅₀ fue 1×10^{-7} M con wt y 4.2×10^{-5} M con ADR^R MCF-7. Para taxol, ID₅₀ fue 6.4×10^{-9} M con wt y 3.1×10^{-6} M con ADR^R MCF-7. El tratamiento secuencial con ADR o taxol y FC-2.15 mostró citotoxicidad aditiva a las diferentes concentraciones ensayadas y con ambas líneas celulares. Concluimos que FC-2.15 es un agente útil contra células tumorales resistentes a quimioterapia con ADR o taxol y su administración combinada merece posteriores estudios.

103. Acción de 17 β-Estradiol, Progesterona, Hidroxi-flutamida y Tamoxifeno en Melanoma Humano. V Morvillo¹, IA Luthy², MI Capurro¹, AI Bravo³, RS Calandra² y J Mordoh¹.

¹IIB-BA "Fundación Campomar", ²Instituto de Biología y Medicina Experimental, Bs. As. y ³Hospital Eva Perón, Buenos Aires.

Habiendo descripto que el andrógeno dihidrotestosterona (DHT) estimula el crecimiento de la línea de melanoma humano IIB-MEL-J y que el antiandrógeno puro hidroxi-flutamida (OH-flu) así como el tamoxifeno (tam) lo inhiben vía un receptor androgénico con características de especificidad atípicas, nos propusimos estudiar: 1) la acción *in vitro* de distintos esteroides 2) el efecto *in vivo* de la flutamida (flu) y del tam en ratones hembras nu/nu NIH portadores de tumores IIB-MEL-J. El efecto de los esteroides sobre el crecimiento celular se midió por incubación de células IIB-MEL-J con 17 β-estradiol (E2) 10^{-9} M, progesterona (Pg) 10^{-9} M y OH-flu 4 µM en presencia de 1% de suero fetal adsorbido con carbón. En los ensayos *in vivo*, se administró flu (1mg/día/ratón) o tam (25µg/día/ratón) y vehículo a 8 y 10 hembras atímicas respectivamente transplantadas con tumores IIB-MEL-J. El aumento significativo del crecimiento celular por incubación con E₂ o con Pg fue inhibido por OH-flu (células/pocillo, 240 hs: control: 71.660 ± 7400 ; E₂: 312.000 ± 12.000 ; E₂+OH-flu: 118.875 ± 13.000 ; Pg: 250.500 ± 8800 ; Pg+OH-flu: 65.000 ± 6000). Por otro lado, animales tratados crónicamente con flu presentaron áreas tumorales significativamente menores a partir del día 33 (c: 1.42 ± 0.35 cm²; flu: 0.56 ± 0.3 cm², p<0.05). La probabilidad de supervivencia al día 186 fue c: 0 y flu: 0.5, con un tiempo de sobrevida mayor en animales tratados (p<0.05). Anima-

les que recibieron tam no mostraron diferencias significativas en el crecimiento tumoral ni en la sobrevida con respecto al control. El antiandrógeno resultó efectivo para inhibir el crecimiento celular inducido por los esteroides así como para disminuir el tamaño tumoral y aumentar la tasa de supervivencia en ratones atímicos hembras.

104. Efecto de compuestos adrenérgicos y sus antagonistas en una línea celular de cáncer mamario inducido en ratas por dimetilbenzotraceno. SM Vázquez, V Wendel, I Luthy.

Instituto de Biología y Medicina Experimental. Buenos Aires.

Habíamos descripto que las células de cáncer mamario humano MCF-7 responden a compuestos α2-adrenérgicos incrementando la incorporación de timidina. Para investigar si este mecanismo era exclusivo de estas células, utilizamos una línea tumoral mamaria de rata desarrollada en nuestro laboratorio (DMBA-1). Las incubaciones con compuestos adrenérgicos en ác. ascórbico se realizaron durante el tiempo óptimo de 4 días, cambios de medio diarios e incorporación de timidina por 24 hs. Los agonistas adrenérgicos epinefrina (E) y norepinefrina (NE) estimularon significativamente la incorporación de timidina a concentraciones 2-100 pM (E 100 pM: 115.6 ± 5.04 ; p<0.05 y NE 30 pM: 120.4 ± 2.33 ; p<0.01), (en % del valor control ± SEM). La incubación simultánea con NE y el antagonista α2- yohimbina (Yo) mostró una reversión parcial de dicha estimulación (Yo 3µM: 76.6 ± 2.18 ; p<0.01) (en % del valor estimulado por NE ± SEM), mientras que los antagonistas α1- prazosin y β- propanolol no la revirtieron. Se concluye que también en células mamaras murinas los compuestos adrenérgicos estimulan a concentraciones pM-nM la incorporación de timidina y el efecto es, al menos en parte α2-adrenérgico.

RENAL II

105. Participación del sistema colinérgico en la diuresis inducida por muscimol en riñón aislado y perfundido de rata. LA Monasterolo, L Trumper, MM Elías.

Farmacología. Facultad Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. CONICET. CIUNR. Rosario. Santa Fé.

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se describió que, en el riñón aislado, el agonista GABA_A muscimol (0.1-75 µM) es capaz de aumentar de manera concentración-dependiente las excreciones fraccionales de agua (EF_{H₂O}) y sodio (EF_{Na}), sin cambios hemodinámicos asociados. Para evaluar la posible participación del sistema colinérgico en estas respuestas se estudiaron en el riñón aislado, luego de la recolección de 2 períodos basales (B) de 5 min, los efectos de: muscimol 75 µM (M, n=4) y M en presencia de atropina 1 µM (M+ A, n=5) durante 3 períodos de clearance. Los resultados de es-

tos 3 periodos se promediaron y expresaron como porcentaje de cambio relativo respecto de B. En un grupo control (C, n=7) se demostró la estabilidad de la función durante el tiempo experimental. Los valores absolutos de EF_{H_2O} y EF_{Na} en B no difirieron entre los grupos estudiados ($C:EF_{H_2O}=22,7 \pm 3,6 \%$; $EF_{Na}=20,8 \pm 3,1 \%$). En M se observó un aumento porcentual en EF_{H_2O} ($57 \pm 7 \%$) y EF_{Na} ($59 \pm 8 \%$) respecto de B, significativamente mayor que en M+A ($EF_{H_2O}=15 \pm 6 \%$; $EF_{Na}=12 \pm 6 \%$). Estos resultados sugieren que los efectos tubulares inducidos por muscimol podrían estar mediados por la activación del sistema colinérgico.

106. Posibles mecanismos involucrados en un estadio temprano de nefropatía diabética. V García, G Girardi, E Ochoa, MM Elías.

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

Anteriormente demostramos que la administración de aloxano a ratas (150 mg/kg sc) produce a los 7 días un cuadro caracterizado por hiperglicemia, ausencia de dislipidemia, tendencia a aumentar de la presión arterial, disminución de VFG y del clearance de PAH y diuresis asociada a glucosuria. El objetivo de este trabajo es determinar posibles mecanismos involucrados en la alteración renal de este estadio temprano de diabetes. Se utilizaron técnicas de clearance, histológicas, histoquímicas, inmunohistoquímicas y espectrofotométricas en 2 grupos experimentales: control (C) y tratados con aloxano (A7). El grupo A7 no mostró variación en la carga excretada en orina de proteínas (mg/min*100g, C (n:5): $7,7 \pm 0,9$; A7 (n:6): $6,1 \pm 1,5$) pero sí en el nivel de glicosilación de las mismas (AbsI555/mg prot, C (n:8): $0,7 \pm 0,1$; A7 (n:12): $5,4 \pm 0,8$), también mostró mayor actividad de mieloperoxidasa en corteza renal (U/mg prot, C (n:5): $20,5 \pm 2,4$; A7 (n:7): $47,9 \pm 4,6$) indicando infiltración leucocitaria. No se observaron cambios histológicos en los riñones A7 pero sí mayores depósitos de lípidos en glomérulos y vasos con posibles implicancias hemodinámicas. Se observaron mayores depósitos de fibronectina en glomérulo e intersticio medular de riñones A7, sin cambios en laminina. Concluimos que las ratas A7 presentaron un estadio temprano de nefropatía diabética caracterizado por alteraciones hemodinámicas asociadas probablemente a alteraciones vasculares y/o estructurales. El proceso inflamatorio y el mayor nivel de glicosilación de proteínas podrían ser responsables de la disfunción renal observada.

107. Alteración de la polaridad del epitelio tubular renal durante la isquemia. G Coux, L Trumper y MM Elías.

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

La polaridad del epitelio del túbulo proximal fue estudiada en un modelo de insuficiencia renal aguda

isquémica, a partir de la distribución de proteínas en los distintos dominios de membrana. Se estudiaron: i) riñones de ratas Wistar macho adultas sin tratamiento previo (C); ii) riñones de ratas sometidos a isquemia unilateral derecha por clampeo de la arteria renal durante 40' (I); iii) riñones contralaterales del grupo ii) (CL). Las vesículas de membrana basolateral (BL) y ribete en cepillo (RC) se separaron en gradiente espontáneo de Percoll y se recolectaron fracciones de 1 ml (F_1-F_{12}). Se midió la actividad de enzimas marcadoras de: BL: Na/K ATPasa; RC: fosfatasa alcalina (FA) y contaminación mitocondrial: succinato deshidrogenasa (SDH). En base al enriquecimiento relativo al homogenado inicial del marcador específico se consideraron F_1 a F_3 como representativas de BL (Na/K ATPasa 12X; FA 3X) y F_5 a F_6 como representativas de RC (Na/K ATPasa 3X; FA 6X). Se informa el promedio de las fracciones representativas. SDH sólo fue significativa en F_{10} a F_{12} . Los perfiles de actividad enzimática de los riñones CL no difirieron de C. La Na/K ATPasa en BL-C= $46,5$ UI/mg, y en BL-I= $22,3$ UI/mg, mientras que FA en RC-C= $4,4$ UI/mg, y en RC-I= $2,5$ UI/mg. En I ambas enzimas se distribuyeron homogéneamente entre todas las fracciones restantes. Las fracciones se sometieron a SDS-PAGE, observándose modificaciones acordes con las variaciones mencionadas. La electrotransferencia de los geles permitió revelar la presencia de Na/K ATPasa mediante un anticuerpo policlonal específico. Los datos muestran la alteración de la polaridad de la membrana plasmática tubular durante la isquemia.

108. Lipoperoxidación y actividades de enzimas de membrana en un modelo de insuficiencia renal aguda (IRA). G Montagna, CG Hofer y AM Torres.

Farmacología. Fac. Cs. Bioq. y Farm. UNR. CONICET. Rosario. Santa Fé.

Trabajos anteriores sugirieron que los daños estructurales y funcionales asociados a la IRA (producida por isquemia) podrían deberse a una disfunción de los sistemas antioxidantes celulares. El objetivo del presente trabajo fue determinar si tal disfunción afecta los niveles de lipoperoxidación (LPO) y las actividades de enzimas (Ez) de membrana. Se clameó la arteria renal derecha en ratas Wistar macho adultas (n=6) durante 50 minutos. Luego se extrajo el riñón derecho (Isquémico, I) y el riñón izquierdo (Control, C). En homogenados de ambos riñones se midieron los niveles de LPO (nmoles MDA/mg Prot.) y las actividades de: glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa, Ez microsomal, μ moles Pi/min/gr Prot.), succinato deshidrogenasa (SuccD, Ez mitocondrial, nmoles cit c/min/mg Prot.), fosfatasa ácida (PAC, Ez lisosomal, μ UI/mg Prot.) y de Ez de ribete en cepillo como γ -glutamyl transferasa (g-GT, μ UI/mg Prot.) y fosfatasa alcalina (PAL, μ UI/mg Prot.). Los resultados obtenidos fueron: LPO (C= $1,39 \pm 0,15$ vs I= $1,33 \pm 0,17$), G-6-Pasa (C= 85 ± 8 vs I= 46 ± 5 , $P < 0,05$), SuccD (C= 47 ± 3 vs I= 53 ± 3), PAC (C= 1383 ± 142 vs I= 1148 ± 70), g-GT (C= 4083 ± 252 vs I= 2423 ± 220 , $P < 0,05$), PAL (C=

270±14 vs I=155±14, $P<0,05$). En este modelo de IRA se observa una disminución de las actividades de γ -GT, PAL y G-6-Pasa sin variación de LPO. El daño funcional de estas enzimas no estaría aparentemente relacionado con modificaciones peroxidativas del entorno lipídico. Estos datos indicarían que las enzimas de membrana apical y microsomal también estarían involucradas en las alteraciones renales descriptas en IRA.

109. Sistemas antioxidantes en insuficiencia renal aguda (IRA) producida por isquemia. G Montagna, C G Hofer, L Sacchi y A M Torres.

Farmacología. Fac. Cs. Bioq. y Farm. UNR. CONICET. Rosario. Santa Fé.

Se ha descripto un desbalance oxidativo en la IRA producida por isquemia y reperfusión. El objetivo del presente trabajo fue analizar el estado de sistemas antioxidantes celulares y el daño estructural en IRA producida sólo por isquemia. Se clampeó la arteria renal derecha en ratas Wistar macho adultas ($n=6$) durante 50 minutos. Luego se extrajo el riñón derecho (Isquémico, I) y el riñón izquierdo (Control, C). En homogenados de ambos riñones se midieron: Glutathione (GSH, nmol/mg Prot.); y las actividades de enzimas antioxidantes [Catalasa (CAT, k/mg Prot.), Glutathione Peroxidasa (GSH-Px, μ mol/min/mg Prot.) y Superóxido Dismutasa (SOD, U/mg Prot.)]. Se midieron también los niveles de Urea (g/l) en muestras de plasma obtenidas antes y después del clampeo de la arteria renal. Los resultados obtenidos fueron: GSH (C= $9,9\pm0,3$ vs I= $8,0\pm1,1$), CAT (C= $4,44\pm0,03$ vs I= $3,85\pm0,15$), GSH-Px (C= $1,39\pm0,07$ vs I= $1,08\pm0,04$, $P<0,05$), SOD (C= 138 ± 6 vs I= 108 ± 4 , $P<0,05$). La relación SOD/GSH-Px no presentó diferencias entre grupos. La uremia presentó un leve incremento (C= $0,56\pm0,04$ vs I= $0,71\pm0,06$). Los estudios histológicos mostraron tumefacción glomerular, necrosis de células tubulares, descamación celular y congestión medular. Estos datos revelarían que la IRA producida por isquemia, en ausencia de reperfusión, se presentaría con disminución de los niveles de GSH-Px y SOD, sin variaciones en GSH, CAT y en la relación SOD/GSH-Px. Se podría sugerir que las alteraciones estructurales y funcionales manifestadas en este modelo de IRA se deberían, en parte, al incremento de radicales libres ocasionado por disfunción de enzimas antioxidantes.

110. Evolución de la función renal en dos líneas de ratas endocriadas: "β" obesas y "α" sin sobrepeso. E Ochoa*, MC Gayol*, E Proto*, S Calderari*, S Weinschelbaum Jairala**

IFISE-CONICET/4, Biología, Bioquímica Clónica*, CIUNR*, F de Bioquímica*, F de C Médicas*, Universidad Nacional de Rosario. Santa Fé.*

Objeto: Comparar entre líneas, a distintas edades, indicadores de la función renal y, además, su evolución dentro de IRneas. Se utilizaron tres grupos de ratas en cada IRnea de 70 (a), 100 (b) y 400 días (c); "n" entre 7 y 12. Entre otras variables se evaluó proteinuria, glucosu-

ria, volumen minuto urinario ($v=0$), tasa de filtración glomerular (TFG), flujo plasmático renal, clearance osmolar, etc. Presentamos solamente los valores de $v=0$ y TFG. $v=\alpha$ "β"= a) $0,019\pm0,002$, b) $0,013\pm0,001$, c) $0,007\pm0,001$; "α"= a) $0,029\pm0,002$, b) $0,019\pm0,001$, c) $0,014\pm0,002$. TFG: "β"= a) $0,555\pm0,07$, b) $0,676\pm0,09$, c) $0,370\pm0,052$; "α"= $0,763\pm0,09$, b) $0,875\pm0,11$, c) $0,482\pm0,06$. Proteinuria y glucosuria fueron mayores en "β" y aparecieron a los 150 y 400 días respectivamente. En los demás indicadores los valores obtenidos fueron mayores en "α". Dentro de líneas empezaban a declinar entre 70 y 150 días salvo en la TFG. Conclusión: Las diferencias entre líneas observadas en función renal ya a los 70 días, coinciden con el aumento de biomasa, presión arterial, triglicéridos totales y VLDLTG que informamos anteriormente; en cambio la evolución dentro de líneas fué similar en "β" y en "α".

TRANSPORTE

111. Flujos iónicos a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (i-Na/Ca) en músculo esquelético (ME). RA Venosa, MC Abel.

Cát. de Fisiología con Biofísica y C.I. Cardiovasculares, Fac. Cs. Médicas, Universidad Nacional de La Plata. Buenos Aires.

Recientemente se caracterizó el i-Na/Ca en ME de rana (J. Physiol. 486:615-627;1995) y se mostró que el i-Na/Ca puede transportar Ni^{2+} (i-Ni/Ca) y Co^{2+} (Medicina 55:528; 1995). Objetivos: determinar qué iones fisiológicos además de Na^+ y Ca^{2+} podrían ser transportados por el i-Na/Ca. El i-Na/Ca se activó por incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producido por cafeína (CAF) 4 mM. Definimos como flujos generados por el i-Na/Ca aquellos inhibibles por amilorida (AMIL) 5mM. Resultados: i-Na/Ca promovió los siguientes flujos ($\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1} \pm \text{ES}$): a) Influjos de Na^+ ($^{24}\text{Na}^+$): $7,6 \pm 1,9$ ($n=6$). b) Flujo neto de K^+ (espectrofotometría de AA): $4,8 \pm 1,2$ ($n=4$; hacia afuera). c) Flujo neto de Ca^{2+} (espect. AA): $0,95 \pm 0,28$ ($n=6$; hacia afuera). También se detectó un aumento de la salida fraccional de Na^+ a través del i-Na/Ca. Conclusión: los datos indican que en ME cuando el i-Na/Ca intercambia $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (modo "forward"), también intercambia Na^+/K^+ y Na^+/Na^+ , lo cual sugiere una estequiometría, que estamos tratando de precisar, más compleja que la simple $3\text{Na}^+/1\text{Ca}^{2+}$ observada en otras células.

112. Transporte De Litio, Sodio Dependiente, En Eritrocitos De Etapas Pre Y Postnatales De Hemopoyesis. D Taborda; M Zamero; R Serrani; JL Corchs.

Cát. Fisiología Humana. Fac. Cs. Médicas (Universidad Nacional de Rosario). Santa Fe 3100 - Rosario.

Se analizaron características cinéticas del intercambiador Na^+/Li^+ , sistema que presenta modificaciones en determinadas condiciones fisiopatológicas. Se emplearon

eritrocitos de cordón umbilical y de adultos normales. Se determinaron flujos unidireccionales de Li^+ en ambos sentidos en función de Na^+ contralateral. Los resultados se ajustaron según expresiones hiperbólicas (o sus transformaciones lineales) indicando una cinética de reacción de tipo Michaelis-Menten con un sitio de reacción para cada reactante. Se determinaron para cada condición experimental valores de K_m (mM) y de $V_{\max}$ (mmoles Li^+ 1^{-1} cél. h^{-1}). El cociente $V_{\max}/K_m$ (factor de asimetría) de eflujo (Li^+) en función del reactante (Na^+) contralateral, de un valor ($\bar{x} \pm S_x$) de 0.15 ± 0.03 ($n=27$) no difirió del valor homólogo para influjo 0.11 ± 0.01 ($n=20$). La constancia de este valor se verifica en presencia de diferencias significativas de K_m y de $V_{\max}$. Valores análogos a los presentados se demostraron para este sistema de intercambio en eritrocitos de adultos normales. Lo anteriormente presentado sugiere que el esquema de transportador simple (posibilidad de intercambio del transportador "libre") no puede descartarse y que la "patente" de asimetría de activación por Na^+ de flujos de Li^+ a través de este sistema de transporte en adultos, se encuentra instalada en eritrocitos de etapas fetales (tardías) de hemopoiesis.

113. Corriente de cloro en fibras musculares y su relación con el voltaje. GC Bertrán, BA Kotsias.

Inst. Inv. Médicas A. Lanari, Universidad de Buenos Aires.

Introducción: Nuestro objetivo fue conocer el efecto de los prepulsos sobre la cinética de la corriente de cloro (ICl) medida en fibras cortas de sapo. **Métodos:** Las fibras fueron despolarizadas en 120 mM KCl y los registros obtenidos al reemplazar el K por Cs, utilizando técnicas de potencial controlado (2 microelectrodos, J. Membrane Biol. 149: 249-255, 1996). **Resultados:** La aplicación de un prepulso de -20 en comparación con otro de -100 mV produjo un incremento y una mayor inactivación de la ICl medida con un pulso test de -140 mV. Los cocientes entre los valores de ICl extrapolados a tiempo cero entre los pulsos positivos sobre los negativos fue de 1.37 ± 0.24 mientras que los de la constante de tiempo fue 0.63 ± 0.09 (media $\pm$ SD, $n=11$). Por otro lado, los pulsos test positivos mayores a 60 mV dieron lugar a la aparición de una corriente saliente, probablemente debida a la activación del canal de rectificación tardía de K y disminuida por la aplicación de 5 mM de 3-4 DAP. **Conclusiones:** El ajuste monoexponencial de la inactivación de la ICl sugiere un esquema de canal abierto-cerrado mientras que el potencial celular positivo activa la ICl. Esto último es apoyado por las mayores corrientes de cola que se obtienen al llevar el potencial a un valor positivo luego de varios pulsos tests que estabilizan la inactivación.

114. Efecto agudo de dos corticosteroides naturales en la cinética de intercambio Na^+/H^+ en células de ribete en cepillo de túbulo proximal de rata. MP Igarreta, JC Calvo, A Paladini, MC Damasco.

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. PRHOM (CONICET). Instituto de Biología y Medicina Experimental. Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular, Buenos Aires.

En la reunión del año pasado, presentamos que la adrenalectomía disminuía la actividad del intercambiador en condiciones basales. En el presente trabajo presentamos los resultados de una terapia de reemplazo utilizando los corticosteroides naturales corticosterona y 18-HO-corticosterona, utilizando la técnica de fluorescencia de naranja de acridina. La adrenalectomía produjo una disminución de la $V_{\max}$ (30800 ± 1424 UF/min) con respecto a las sham operadas (41700 ± 654 UF/min). La inyección a ratas adrenalectomizadas de 220 μg /animal de corticosterona o de 12 μg /animal de 18-HO-corticosterona, 120 y 60 min antes del sacrificio, incrementó la $V_{\max}$ a 64600 ± 4227 UF/min y 66990 ± 4988 UF/min, respectivamente. El tratamiento con 6 μg de aldosterona también aumentó significativamente la $V_{\max}$ respecto de las adrenalectomizadas (51633 ± 7486 UF/min). En ningún caso se modificó la K_m . Esto confirma estudios previos por micropunción y micropérfusión del túbulo proximal in vivo, donde se demostró que los tres esteroides aumentaban el flujo de hidrogeniones, disminuyendo el tiempo medio de acidificación tubular. La acción de la aldosterona podría estar mediada por su unión a los receptores para glucocorticoides o por un mecanismo independiente de los mismos.

115. Liberación espontánea en sinapsis neuromuscular de mamífero: su control por varios canales de calcio. AS Losavio, S Muchnik.

Inst. Inv. Médicas A. Lanari. UBA. Buenos Aires.

La secreción espontánea de acetilcolina en sinapsis neuromuscular de mamífero puede ser explicada en parte por el influjo de Ca^{2+} a través de canales de calcio voltaje dependiente (CCVD) tipo L ubicados en las zonas activas de las terminales nerviosas. La nifedipina (Nif), bloqueante de CCVD tipo L, reduce la frecuencia de los potenciales de placa miniatura (fMEPP); sin embargo este efecto es menor al observado en Ringer Ca^{2+} 0-EGTA, por lo que otros CCVD parecerían también estar involucrados. Con el propósito de verificar esta hipótesis, estudiamos el efecto de la ω -Conotoxina GVIA (ω -Cgtx) 5 μM , bloqueante de CCVD tipo N, sola y combinada con Nif 5 μM , en mdsculos diafragma de rata, con técnica de microelectrodos convencional. Cuando la ω -Cgtx fue aplicada primero, ésta redujo la fMEPPs un $33.6 \pm 0.6\%$ ($n:30$ fibras) de la registrada en la solución control, pero sólo un $12.7 \pm 1.1\%$ ($n:30$) cuando fue aplicada luego de la Nif. La aplicación inicial de Nif redujo la fMEPPs un $45.7 \pm 0.8\%$ ($n:30$), pero sólo un $25.3 \pm 0.8\%$ ($n:30$) cuando se la utilizó luego de la ω -Cgtx. El efecto de la aplicación combinada de ω -Cgtx y Nif ($58.6 \pm 0.4\%$, $n:50$) fue claramente menor que la suma lineal de sus valores individuales, no siendo compatible con un bloqueo aditivo. Estos resultados sugieren que los

CCVD tipo L y N se encuentran en los mismos botones terminales y que ambos controlan la liberación espontánea en los mismos sitios individuales de liberación.

POSTER MIXTO

- 116. Alfabetoproteína en suero materno (AFPSM) elevada asociada a anomalías ecográficas prenatales.** L López Miranda, M Segovia, NI Sgan-zetta, ME Mollica, M Aguirre, L Alba.

Instituto Nacional de Genética Médica. Buenos Aires.

El screening de AFPSM (dosada por MEIA en IMX de ABBOT) durante el segundo trimestre de gestación permite detectar anomalías fetales y placentarias y junto con la ecografía fetal son técnicas no invasivas utilizadas para la detección prenatal de estos desórdenes. El objetivo de esta presentación es comunicar un hallazgo dentro del screening poblacional de AFPSM en nuestra institución en más de mil determinaciones realizadas desde Junio de 1994 a la fecha. Presentamos una paciente de 32 años con antecedente de abortos espontáneos y un huevo anembrionado que concurre para realizar dosaje de AFPSM en semana 17 de gestación. Se obtiene un valor significativamente elevado de 6.4 MoM (V.N:0.5-2.0 MoM) realizándose estudio ecográfico de nivel 2 y hallándose una placenta hidrópica, quiste de plexo coroideo y ventriculomegalia. Se indicó estudio prenatal en líquido amniótico resultando el cariotipo 46,XX. La segunda determinación de AFPSM muestra un valor también elevado de 4.0 MoM a las 18 semanas. Los controles ecográficos en semana 20 y 23 muestran ventriculomegalia asimétrica, persistencia de quiste de plexo coroideo, y se observa crecimiento de fémur y húmero en el quinto percentilo. Los movimientos fetales limitados al tronco y los miembros inferiores aparecían con espasticidad en hiperextensión. La cantidad de líquido amniótico estaba aumentada. En controles ecográficos posteriores se observa evolución desfavorable produciéndose rotura espontánea de membrana a las 32 semanas de gestación realizándose una cesárea de urgencia. El R.N. fue una niña con fenotipo peculiar que falleció a los pocos segundos de nacer confirmándose clínicamente los hallazgos ecográficos previos. Se verifica la importancia de la realización de AFPSM para el monitoreo precoz de anomalías fetales y placentarias como métodos no invasivos prenatales.

- 117. Evaluación oftalmológica en escuelas rurales de la línea sur de la Provincia de Río Negro.** HD Nano(*); ME Nano(*); M Yappert(*); L Fernández Irigaray(*); G Bianchi(*); A. Berra(**).

(*)Fundación Oftalmológica Hugo Nano. (**)Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Propósito: Detección y solución de problemas oftalmológicos en escuelas primarias rurales de la Provincia

de Río Negro. **Métodos:** En las escuelas se evaluaron 2451 alumnos (6 a 14 años) de 55 escuelas rurales de la Provincia de Río Negro. La evaluación oftalmológica fue dividida en 3 etapas. En la primer etapa, los niños fueron atendidos secuencialmente en distintos puestos: 1) Historia Clínica, 2) Agudeza Visual, 3) Refracción automática computarizada, 4) Refracción subjetiva, Presión Intraocular y Oftalmoscopia indirecta, 5) Dilatación de pupilas, 6) Biomicroscopia y Oftalmoscopia Binocular Indirecta (OBI), 7) Examen de motilidad ocular y 8) Exámenes de Laboratorio. La segunda etapa, se efectuó en Ingeniero Jacobacci, donde se entregaron anteojos y se re-evaluaron aquellos niños que serían operados; La tercer etapa se realizó en la Clínica de Ojos Dr. Nano, San Miguel, Buenos Aires en donde se efectuaron las cirugías de alta complejidad. **Resultados:** De los 2451 niños evaluados, 577 necesitaron anteojos y de los 126 niños que en el momento de la revisión ya usaban anteojos graduados, a 99 de ellos se debió actualizar la corrección. Se efectuaron 26 cirugías de estrabismo, 3 de catarata con lente intraocular, 2 vitrectomías y 1 ptosis. **Conclusión:** El 30 % de los alumnos revisados presentó algún tipo de ametropía de los cuales el 82% de ellos no conocía su problema. Es importante destacar que solo el 10% de las ametropías son consideradas normales en los niños. Aquellos que presentaban estrabismo se observó un alto porcentaje de ambliopías, hecho que no ocurren en poblaciones correctamente asistidas. El 68% presentó diagnóstico de esotropía, las exotropías representaron el 32% restante. El elevado número de ametropías y ambliopías indica la necesidad de campañas destinadas a la infancia, y así evitar daños irreparables de la visión. La escuela representa un ámbito adecuado y confiable en las comunidades rurales. La atención primaria ocular que consiste en medición de la agudeza visual puede ser llevada a cabo por el docente en el aula; para lo cual es necesaria un breve entrenamiento y entrega de cartilla con optotipos. (Este estudio fue financiado por UNICEF argentina).

- 118. Cambios en el radio de curvatura de la cornea (RCC) con la exposición a monitores de computadoras.** A. Pérez de la Hoz.

Escuela de Ciencia y Tecnología. Universidad de General San Martín. Buenos Aires.

Introducción: La exposición continua a monitores de computadoras genera trastornos visuales y una disminución del espesor de la capa de lágrima que lubrica el ojo. Para detectar posibles cambios en la geometría de la cornea medimos RCC de sujetos jóvenes emétopes expuestos a la pantalla en forma continua. **Método:** Se midieron los RCC en los ejes de 0°(H) y 90°(V) antes de la exposición (t=0) a los 60 y 120 min.. Se informa la variación en dioptrías (D) para ambos ejes (ΔH) y (ΔV) con respecto a t=0 y el valor absoluto de la diferencia entre ΔH y ΔV para cada tiempo (DHV). Los grupos fueron :A) Control B) Expuestos a monitores C) Expuestos a monitores con lágrimas artificiales. **Resultados:** En el grupo A no se observaron cambios en los RCC en am-

bos ejes. En el grupo B a los 60 min (ΔH) fué $0,85 \pm 0,21D$, (ΔV) $1,01 \pm 0,28D$ y (ΔHV) $0,35 \pm 0,086D$. A los 120 min (ΔH) fué $1,31 \pm 0,66D$, (ΔV) $1,19 \pm 0,42D$ y (ΔHV) $0,57 \pm 0,19D$. Todos los valores son significativos con $p < 0,05\%$. La aplicación de lágrimas artificiales (grupo C) no modificó las alteraciones siendo a los 60 min (ΔH) $0,78 \pm 0,18D$, (ΔV) $0,82 \pm 0,18D$, (ΔHV) $0,49 \pm 0,09$ y a los 120 min (ΔH) $0,59 \pm 0,13D$, (ΔV) $0,94 \pm 0,21D$ y (ΔHV) $0,42 \pm 0,13D$. Los sujetos examinados tenían sus RCC normales en días posteriores. **Conclusiones:** La exposición a pantallas de video induce astigmatismo transitorio que no es prevenido con el uso de lágrimas artificiales.

INTERDISCIPLINARIA

- 119. Anticuerpo monoclonal (AMC) FC-5.01: epítipo antigénico y acción terapéutica del radioinmunoconjugado en tumores humanos xenotransplantados.** MM Barrio¹, M Viaggi², E Dorio², L Bover¹, P Portela¹, SG de Castiglia², J Mordoh¹.

¹IIB-BA, «Fundación Campomar», Buenos Aires;

²CNEA, Ezeiza, Buenos Aires.

En un estudio previo describimos las características del AMC FC-5.01: 1) alta reactividad con melanomas y tumores de mama humanos; 2) poca afinidad por tejidos normales; y 3) capacidad de internalizarse en células que expresan el antígeno (Ag) 5.01. En este estudio profundizamos la descripción del Ag y evaluamos la utilidad terapéutica del AMC radioconjugado. Ensayos de Western-blot sobre extractos de membrana de tejidos o células de mama y melanoma Ag 5.01*, realizados en condiciones desnaturizantes no reductoras, indicaron que el AMC reconoce una glicoproteína heterogénea, hidrofóbica, con puentes disulfuro implicados en el reconocimiento antigénico, sin carbohidratos en el epítipo reactivo. Presenta una ancha banda de peso molecular entre 30 y 60 kD y un núcleo proteico de 24 kD. Radioinmunoconjugados (RIC) de FC-5.01 con ^{99m}Tc, permitieron localizar xenotransplantes de tumores humanos de mama mediante imágenes en cámara gamma. La acción terapéutica de 131I-FC-5.01 en el mismo modelo in vivo dio como resultado un volumen tumoral promedio en el grupo tratado de $422 \pm 350 \text{ mm}^3$ a los 36 días, siendo el valor correspondiente al control $3561 \pm 1820 \text{ mm}^3$. Los resultados observados nos permiten concluir que el Ag reconocido pertenecería a la familia del CD63 (descrito en melanomas y otros tumores) y demuestran la utilidad del RIC FC-5.01 en el tratamiento y detección de tumores humanos.

- 120. Superantígenos y retrovirus MMTV: aumento de la tumorigenicidad por recombinación entre MMTV exógenos y endógenos.** I Nepomnaschy, V Buggiano, A Goldman, A Déroche, P Bekinshtein, P Berguer, I Piazzon.

IIHEMA, Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires.

El MMTV exógeno BALB14 detectado en ratones BALB/c expresa un superantígeno (SAG) que delecciona clones TV β 14+. Este virus recombina con el Mtv-7 endógeno no productivo en huéspedes F1(BALB/cxA-KR) adquiriendo la región hipervariable del gen sag de dicho provirus y la capacidad de deleccionar clones TV β 6+. Se investigó la capacidad tumorigénica del BALB14 y del MMTV-7 recombinante. El BALB14 induce adenocarcinomas mamarios hormono-dependientes en el 30% (29/100) de las hembras multiparas. Sólo el 5% (3/60) de las hembras vírgenes desarrolla tumores. Desarrollamos una línea de BALB/c infectada con el MMTV-7 por amantamiento con una nodriza F1. Por citometría de flujo se determinó que la hembra fundadora de esta línea deleccionaba a los 30d clones TV β 14* ($2,3 \pm 0,1\%$ (6) vs $8,9 \pm 0,1\%$ (6)) en controles libres de virus y sólo a los 6 meses deleccionaba clones T V β 6* ($1,6 \pm 0,1\%$ (6) vs. $10 \pm 0,2\%$ (6)). En la tercera generación, la deleción de células TV β 6* puede detectarse a los 10d. Habíamos demostrado que el MMTV-7 se expresaba en 10/11 tumores en esta línea, siendo el único detectado en 7/11. La incidencia tumoral en multiparas fue del 85% (50/59) y en vírgenes del 6% (2/33). Se demostró que la inoculación de leche en ratones libres de virus indujo una proliferación de clones T reactivos al SAG del MMTV-7 significativamente superior a la de aquellos reactivos al SAG del BALB14. Los resultados muestran que la recombinación entre MMTV exógenos y virus endógenos no productivos puede originar variantes altamente tumorigénicas. Se discute el rol de la adquisición de SAGs estimulatorios en la amplificación del virus recombinante.

- 121. Regulación de la esteroidogénesis testicular por óxido nítrico (NO).** K. Del Punta, ME Sanchez-Ruiz, OP Pignataro,

IBYME, CONICET, Buenos Aires.

Tanto macrófagos testiculares como células endoteliales, las cuales se encuentran íntimamente asociadas a las células de Leydig, constituyen una fuente potencial de NO en el testículo. Se estudió el efecto de dadores de NO (SNAP, DETA y DEA: 0-1 mM), en incubaciones a 4h, sobre la esteroidogénesis en las células MA-10 y en células de Leydig purificadas de ratas. Los dadores de NO inhibieron de manera dependiente de la dosis la esteroidogénesis inducida por dosis máximas de hCG y dbAMPc en ambos tipos celulares (para 1mM de los dadores: 50-70% de inhibición en todos los casos) y la inhibición fue revertida por hemoglobina, mostrando que los efectos son producidos por NO. El efecto inhibitorio no estuvo mediado por GMPc, dado que el NO no incrementó la producción de GMPc y los análogos de GMPc no reprodujeron los efectos del NO. El NO tampoco modificó la producción de AMPc. En incubaciones en presencia de 22R-HO colesterol, el NO inhibió la síntesis de progesterona en células MA-10 (45% de inhibición), pero en presencia de pregnenolona se revirtió la inhibición. Por otro lado, se comenzó a estudiar la expresión de la NO sintasa (NOS) en las cé-

lulas MA-10. Se obtuvieron las secuencias del Gene Bank y se realizó RT-PCR de las NOS endotelial e inducible. En ninguno de los dos casos se encontró amplificación, lo cual concuerda con resultados de otros autores que detectaron sólo la NOS neuronal por inmunohistoquímica. **Conclusiones:** El NO inhibe la síntesis de esteroides en células de Leydig uniéndose al grupo hemo de la enzima que escinde la cadena lateral del colesterol (P450_{C₁₇20}). Se sugiere que el NO puede ser un regulador parácrino y/o autócrino de la esteroidogénesis testicular.

122. Mecanismos de modulación de la sensibilidad a glucocorticoides por las citoquinas. MA Costas, D Kovalovsky y E Arzt.

Instituto de Investigaciones Médicas, Dpto de Biología, UBA. 1427 Buenos Aires.

Hemos demostrado previamente que el TNF- α y la IL-1 aumentan la actividad transcripcional del receptor de glucocorticoides (GR) inducida por glucocorticoides (GC) en distintas líneas celulares transfectadas con un plásmido reporter llevando elementos respondedores a GC (GRE). En células blanco de TNF- α y GC determinamos: 1) TNF- α aumentó el N° de GR en células L-929 y 2) por transfección de las mismas con un plásmido reporter llevando el promotor de GR que este efecto es a nivel transcripcional, 3) por ensayos de movilidad electroforética utilizando extractos nucleares de L-929 estimuladas con TNF- α 0.02 ng/ml, DEX 10 nM ó TNF- α +DEX, que las citoquinas aumentan la unión de GR a GRE (45 min, 1.8 x), mientras que la expresión del factor NFkB inducido por TNF- α no fue afectada por GC. 4) Como correlato biológico de estos mecanismos, un priming de TNF- α (no citotóxico) aumentó la sensibilidad a la protección por GC de la apoptosis inducida por esta citoquina ($p < 0.001$). El organismo se protege de una respuesta inmune exacerbada, no sólo por un aumento de GC por citoquinas, sino también, aumentando la sensibilidad a los mismos: vía un aumento en el N° de GR, en el binding a GRE y de la transcripción de sus genes blanco (ej. genes protectores de la apoptosis inducida por TNF- α). Estos mecanismos contribuyen a aumentar la actividad antiinflamatoria e inmunosupresora de GC para mantener la homeostasis.

123. Interacción de Anticuerpos Chagásicos con el Tercer Dominio Extracelular del Receptor Muscarínico Cardíaco humano. Implicancias Funcionales y Patológicas. JC Goin, C Pérez Leirós, ES Borda, L Sterin-Borda.

CEFYO-CONICET y Cátedras de Farmacología, Facultades de Odontología y Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Previamente comunicamos la presencia de anticuerpos (Acs) séricos, en pacientes chagásicos (ch), capaces de interactuar con receptores muscarínicos (mAChRs) cardíacos. En este trabajo demostramos que una fracción de estos Acs interactúan específicamente con el tercer

dominio extracelular del mAChR humano (subtipo M₂). A partir de 7 sueros ch y 7 sueros normales (N) se purificaron las fracciones IgG y se evaluó la reactividad de los Acs por ELISA, utilizando como antígeno un péptido sintético (pM₂) correspondiente a la secuencia 169-192 del receptor (DO_{405nm}, IgG (5.10⁻⁷ M) N: 0.12 $\pm$ 0.04; ch: 0.54 $\pm$ 0.04). Los Acs anti-péptido purificados por inmunoadinidad a partir de las IgGch (IgGch a-pM₂), reconocieron a los mAChRs de las membranas cardíacas de rata sometidas a inmunoblotting y esta interacción fue impedida por el pM₂. Las IgGch a-pM₂ mostraron actividad agonista muscarínica sobre aurículas aisladas de rata, ya que: I. Disminuyeron la contractilidad (dF/dt, g/s, IgG N: 8.3 $\pm$ 0.5; IgGch a-pM₂ : 3.9 $\pm$ 0.2; II. Incrementaron los niveles de GMPc (pmol/g, IgG N: 67.6 $\pm$ 5.6; IgGch a-pM₂ : 125.5 $\pm$ 1.8); III. Inhibieron el aumento de AMPc (pmol/mg, IgG N: 3.5 $\pm$ 0.3; IgGch a-pM₂ : 1.1 $\pm$ 0.2; n=7, en cada grupo). Estos efectos mimetizaron los de carbachol y fueron bloqueados por el pM₂ y por atropina. La relevancia clínica de estos hallazgos se demostró al obtener una fuerte asociación ($\chi^2 = 32.4$, $p < 0.001$) entre la presencia de Acs séricos a-pM₂ y manifestaciones de disautonomía en los pacientes, sugiriendo su posible utilización como marcadores tempranos de disfunción autonómica cardio-vascular.

124. Inhibición de aromatasa, una nueva actividad de las lactonas sesquiterpénicas. Relación estructura-actividad. ¹J Blanco, ²R Gil, ³C Alvarez, ²T Meragelman, ²J Oberti, ²V Sosa, ¹L Patrino, ¹S Genti y ¹A Flury.

¹Dpto. de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas (UNC). ²Instituto multidisciplinario de Biología Vegetal (CONICET). Córdoba. Argentina.

Se investigó el mecanismo de inhibición de un nuevo grupo de inhibidores no-esteroides de la actividad del complejo enzimático aromatasa (citocromo P-450 19). Los compuestos pertenecen al grupo de las lactonas sesquiterpénicas (LS). Las LS 10epi-8desoxicumambrina B (K_i = 4.0 μ M), deshidroleucodina (K_i = 21.0 μ M) y ludartina (K_i = 23.0 μ M) son inhibidores competitivos de la aromatización. Mediante espectroscopía UV-vis se demostró que 10-epi y deshidroleucodina son ligandos tipo II, lo cual refleja un desplazamiento del sustrato (testosterona) del sitio activo. Las constantes de disociación espectral usando preparaciones de enzima parcialmente purificadas fueron K_{sapp} = 29 μ M para 10-epi y K_{sapp} = 50 μ M para deshidroleucodina. Los datos sugieren que el grupo OH del C-10 de 10 epi puede ser el ligando axial del hierro hemínico del sitio activo. El desplazamiento del heteroátomo a diferentes posiciones disminuye la interacción con el hierro. Presentamos los modelos generados por computadora que apoyan el mecanismo de acción propuesto.

125. La sobreexpresión intracerebral del Gen del Precursor de la TRH (pre-TRH) produce hipertensión arterial: reversión por tratamiento antisense. SI García, PI Porto, AL Alvarez, D Shaurli, S Finkielman, CJ Pirola.

Departamento de Sustancias Vasoactivas, Instituto de Investigaciones Médicas "A. Lanari". Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

La TRH central regula la función cardiovascular y participaría en el desarrollo de hipertensión espontánea de la rata. Para contrastar la hipótesis de que un aumento de la TRH central induce hipertensión, estudiamos el efecto de la sobreproducción del pre-TRH mediante la transfección *icv* con el plásmido de expresión eucariota pCMV-TRH que contiene el cDNA del pre-TRH acoplado al promotor del CMV. Se verificó su transcripción *in vitro* en células U373-MG mediante Northern blot e *in vivo* mediante RT-PCR. El pCMV-TRH (100ug) produjo un aumento significativo del contenido de TRH diencefálica entre las 24-72h con respecto a la inyección del vector libre de inserto (24 h: 411 ± 15 vs 305 ± 5 ; 48 h: 606 ± 76 vs 320 ± 10 y 72 h: 398 ± 20 , respectivamente) e incrementó la PA mmHg significativamente (24 h: 42 ± 5 vs 4 ± 1 ; 48 h: 50 ± 3 vs 4 ± 2 ; 72 h: 22 ± 3 vs 1 ± 3) sin alterar la frecuencia cardíaca. El efecto presor es dosis dependiente. Para analizar la especificidad de estos efectos se estudió la acción de oligonucleótidos fosforilados de secuencia sense(S), antisense (AS) y antisense estabilizado en 3'(ASe) dirigidos contra la zona del codón ATG. Ningún oligo *per se* modificó las variables estudiadas y sólo el ASe inhibió el aumento de TRH (control: 346 ± 54 , pCMV-TRH: 854 ± 63 y pCMV-TRH+ASe: 388 ± 10). En síntesis este modelo serviría para analizar la efectividad de tratamientos antisense e indicaría que el aumento primario de TRH central produce hipertensión arterial.

- 126. Familia novel de fosfoproteínas en el mecanis de acción de hormonas proteicas.** CV Finkielstein, CB Cymeryng, MF Cornejo Maciel, C Paz, MI Neuman, PM Maloberti, AR Solano, EJ Podestá.

Lab. HRDC. Dto. de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.

Hemos descripto una fosfoproteína proteinasa novel (p43) ACTH, AMPc y PKA dependiente intermediaria en la regulación aguda de la síntesis de esteroides en zona fasciculata de adrenal de rata, a través de la liberación de ácido araquidónico vía fosfolipasaA₂. El objetivo fue estudiar a p43 como integrante de una familia de fosfoproteínas intermediarias en varios sistemas de transducción de mensajes. p43 y su transcripto fueron encontrados en zona fasciculata y glomerulosa (3.3 Kb), ovario y células de Leydig (3.3 y 2.5 Kb) y en otros tejidos no esteroideogénicos (corazón, riñón, hígado) de rata. En hígado p43 mostró regulación hormonal por glucagon. ACTH aumentó en forma transitoria el nivel de mensajero de p43 en zona fasciculata. El efecto máximo se observa a los 15 min por densidad óptica integrada (control vs ACTH 22.5 vs 30.3 en unidades arbitrarias). Estos resultados muestran por primera vez una regulación aguda de la transcripción mediada por ACTH. Rastros sobre una biblioteca de cDNA de riñón permitieron aislar un fragmento de cDNA cuya secuen-

cia codificante presenta un 90% de homología con adrenal e hígado excepto una región novel de 150 bp. Estos resultados apoyan la hipótesis de que p43 pertenece a una nueva familia de fosfoproteínas con actividad de proteasa, participando en los diferentes estímulos mediados a través de quinasas de proteínas activadas por diferentes hormonas.

- 127. Función de la Variante ED-I+ de "Splicing" Alternativo de la Fibronectina en el Desarrollo Folículo.** AA Colman Lerner*, ML Fischman*, GM Lanuza*, P Cramer**, AR Kornblihtt** y JL Barañao*.

*IBYME y Dto de Qca Biológica, FCEyN, UBA; **INGEBI y Dto de Cs. Biológicas, FCEyN, Universidad de Buenos Aires.

En el presente estudio se analizó la posibilidad de que las distintas formas de fibronectina (FN), producidas como resultado de la maduración ("splicing") alternativa del mensajero, ejerzan funciones diferenciales en el desarrollo folículo. En particular se determinó la presencia de la región ED-I, ausente en la FN plasmática, tanto a nivel de mensajero como de proteína, durante este proceso. El análisis por Western blot de los niveles de FN en fluidos folículos correspondientes a distintas etapas del desarrollo mostró marcadas variaciones en la concentración de FN-ED-I+ mientras que los de FN total permanecieron relativamente constantes. En folículos correspondientes a la fase de selección se observó una correlación inversa entre los niveles de FN-ED-I+ y los de estradiol ($P < 0.001$). El tratamiento con estradiol no tuvo efecto sobre el "splicing" alternativo de FN en cultivos de células de la granulosa bovina, mientras que el AMPc inhibió 10 veces la incorporación de ED-I. Por otra parte, el factor de crecimiento transformante tipo b (TGF-b) estimuló 3 veces la producción de FN total y 2 veces la inclusión de ED-I. Este efecto fue verificado tanto a nivel de la proteína (Western blots) como del ARNm (Northern blots). Un péptido correspondiente a la región ED-I produjo un aumento de 3.5 veces ($p < 0.05$) en la incorporación de timidina tritiada al ADN en una línea de células de la granulosa bovina (BGC-1) mientras que el péptido correspondiente a las regiones flanqueantes no tuvo efecto. Estos resultados plantean una nueva forma de regulación mediante la cual cambios cualitativos en la estructura primaria de la FN podrían mediar algunas de las acciones de gonadotropinas y factores intraováricos durante el desarrollo folículo.

ENDOCRINOLOGIA III

- 128. Influencia del núcleo anterodorsal talámico sobre el eje hipofiso-adrenal y receptores b-adrenérgicos cardíacos en ratas sometidas a estrés crónico.** M Suárez, M Maglianesi, N Perassi, AR Fernández, JE Enders, J Palma, P Paglini.

Instituto de Fisiología, Fac. Cs. Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Los núcleos límbicos talámicos, en ratas, están involucrados en la regulación de la función cortico y medulo adrenal en situaciones basales y de estrés. En este trabajo se estudia la participación del núcleo antero dorsal talámico (NADT) en los niveles de corticosterona plasmática (C_p) y adrenal (C_A), ACTH plasmática ($ACTH_p$) y su relación con la afinidad y densidad de receptores β -cardíacos en condiciones de estrés aleatorio. Treinta días después de la lesión la $ACTH_p$, C_p y C_A basales fueron significativamente mayores que en ratas falsamente lesionadas (control) ($p < 0,05$). El estrés aleatorio (durante 24 días) y el de inmovilización (12 días), produjeron un significativo aumento en $ACTH_p$ y C_p ($p < 0,05$) y disminución en C_A al comparar con ratas no estresadas. La C_A en ratas lesionadas y estresadas (ambos tipos) fue significativamente menor que las lesionadas no estresadas. $ACTH_p$ en lesionadas y estresadas (ambos tipos) fue menor que su control ($p < 0,05$). La densidad y afinidad de receptores β -cardíacos fue determinada en 45 ventrículos con dihidroalprenolol tritiado con y sin propranolol 1 μM . La afinidad no se modificó en ningún grupo y la densidad fue significativamente mayor en los controles al comparar con los normales ($p < 0,01$), no habiendo diferencias entre ratas lesionadas con estrés y normales. Podemos concluir que el NADT en ratas participaría en la regulación del sistema hipofisoadrenal y a través de este en la densidad de los adrenoreceptores β -cardíacos. Trabajo subsidiado por la SeCyT-UNC y CONICOR.

129. Papel de TNF- α sobre la actividad celular adenohipofisaria. S Theas, D Pisera, A De Laurentiis, M Velardez, B Duvilanski, A Seilicovich.

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

TNF- α es un mediador importante de la respuesta hormonal durante la inflamación y el shock endotóxico. Con el objeto de investigar el efecto de TNF- α sobre la proliferación celular adenohipofisaria, estudiamos el contenido de ADN (método fluorométrico) y el número de células activas (método colorimétrico con sal de tetrazolio MTT). TNF- α (50 ng/ml) incrementó el contenido de ADN y el número de células activas cultivadas en DMEM pero no produjo modificaciones en cultivos en MEM D-Valina (medio que inhibe la proliferación fibroblástica). También se determinó el efecto de lipopolisacárido bacteriano (LPS) sobre la liberación de TNF- α (ELISA) y prolactina (PRL) (RIA). LPS (0.1 $\mu g/ml$) aumentó el TNF- α liberado por adenohipofisis de ratas castrada cultivadas en presencia de estradiol ($10^{-8} M$) (C: 79.49 $\pm$ 4.85, LPS: 271.50 $\pm$ 10.89 pg/ml) y de ratas lactantes (C: 80.89 $\pm$ 6.71, LPS: 271.86 $\pm$ 13.92) e inhibió la liberación de PRL. Nuestros resultados indican que LPS afectaría la liberación de PRL por estimulación de la liberación de TNF- α . TNF- α no modificaría la proli-

feración ni tendría un efecto citotóxico sobre las células secretoras de la adenohipofisis.

130. Efecto de la castración y reemplazo con andrógenos sobre la inmuno y bioactividad de isoformas de FSH hipofisaria en ratas achos prepúberes. SB Rulli, S Creus, E Pellizzari, S Cigorraga, RS Calandra, S Campo.

Instituto de Biología y Medicina Experimental (CONICET); CEDIE, Htal. de Niños R Gutiérrez, Buenos Aires; Cát. Endocrinología, Fac. Cs. Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires.

Hemos descripto previamente el efecto de los antiandrógenos sobre la distribución y bioactividad de isoformas de FSH hipofisaria (Neuroendocrinology, 1996). En este trabajo se estudió la inmuno (I) y bioactividad (B) de FSH hipofisaria en ratas macho de 24 días de edad, en condiciones que modifican los niveles séricos de FSH-I: controles (C), castradas (Cx) y Cx+40 mg/día de propionato de dihidrotestosterona (Cx+40), durante 7 días. Tres grupos de isoformas fueron aislados de citosol de hipófisis utilizando cromatografía en conca-valina A: NR (no retenidas, estructuras triantenarias), DR (débilmente retenidas, biantenarias), FR (fuertemente retenidas, alta manosa e híbridos). La proporción (%) de isoformas NR de FSH-I aumentó en Cx+40 (C: 9 $\pm$ 1 vs Cx+40: 20 $\pm$ 1, $p < 0,05$; Cx: 11 $\pm$ 1), DR disminuyó en Cx (C: 43 $\pm$ 3 vs Cx: 28 $\pm$ 2, $p < 0,05$) y se restableció en Cx+40 (39 $\pm$ 1), y FR aumentó en Cx (C: 48 $\pm$ 4 vs Cx: 61 $\pm$ 2, $p < 0,05$) y se restableció en Cx+40 (41 $\pm$ 2). La relación B/I de NR y DR no varió, mientras que FR aumentó en Cx (C: 0.38 $\pm$ 0.02 vs Cx: 0.53 $\pm$ 0.03, $p < 0,05$) y se restableció en Cx+40 (0.30 $\pm$ 0.04). En conclusión, la presencia de andrógenos a niveles fisiológicos favorecería la formación de isoformas de FSH con cadenas de oligosacáridos complejas, y modularía la bioactividad asociada a las mismas.

131. Subunidad α de hormonas glicoproteicas en el suero de pacientes acromegálicos y su ARN mensajero en los tumores somatotrofos. GA Machiavelli, R Artese, H Benencia, O Bruno, A Basso y JA Burdman.

División Endocrinología, Cátedra de Neurocirugía Hospital de Clínicas, UBA, Departamento de Endocrinología, Fundación CIMAE. Buenos Aires.

En busca de parámetros útiles para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes portadores de tumores hipofisarios, encontramos en el suero de acromegálicos (5/6 casos estudiados), niveles de subunidad α de hormonas glicoproteicas francamente más elevados que en sujetos normales y con tumores clínicamente no funcionantes. (acromegálicos: 5,0 $\pm$ 1,1 (para valores normales de 0,52 $\pm$ 0,2 en hombres; 0,8 $\pm$ 0,5 en mujeres) $P < 0,01$). Solo un paciente respondió positivamente al TRH elevando los valores de sub. α y ninguno respondió al GnRH. Para investigar el origen de la sub. α sérica, se estudió la presencia de ARNm mensajero en las células

tumorales por Northern blot utilizando la sonda específica radiactiva. De 7 tumores somatotrofos investigados, encontramos ARNm mensajero de suba en 4. La presencia de ARNm mensajero de somatotrofina en estos tumores corroboró su estirpe somatotrofa. Los resultados demuestran: 1) Valores aumentados de suba en un alto porcentaje de pacientes acromegálicos, 2) La presencia de ARNm mensajero de suba en los adenomas indicaría el origen tumoral de este péptido. Esto sugeriría que las células tumorales podrían sufrir un proceso de dediferenciación celular con activación del gen de la suba. Contrato C11*-CT93-0025: D G 12HSMU, EEC; U.B.A. ME-70 y CONICET.

- 132. Isoformas inmuno y bioactivas de FSH circulantes durante la pubertad en el varón.** S Creus, S Gottlieb, C Bergadá, E Pellizzari, S Cigorraga, S Campo.

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

Trabajos previos publicados no han podido detectar cambios en la bioactividad de FSH circulante en distintos estadios del desarrollo puberal del varón por determinación directa en suero. Se desconoce si existen cambios en la distribución de isoformas de FSH en los distintos estadios del desarrollo puberal. El objetivo de este trabajo fue determinar la bioactividad luego de isoelectroenfoque preparativo y el perfil de distribución de isoformas de FSH utilizando cromatografía en Concanavalina-A en: pubertad temprana (PT, n= 13), pubertad media (PM, n= 10) y pubertad avanzada (PA, n= 9). La relación bio-inmunoactividad de la FSH total fue: PT: 0.6; PM: 2.4; PA: 0.3. Se separaron en el isoelectroenfoque 5 grupos de isoformas con los siguientes puntos isoelectrónicos (pI): I: pI: 3.0-3.5; II: pI: 3.5-4.0; III: pI: 4.0-4.5; IV: pI: 4.5-5.0 y V: pI: 5.0-5.5. La distribución relativa (%) fue: PT: I: 23; II: 43; III: 11; IV: 23; V: ND (no detectable). PM: I: ND; II: 26; III: 40.5; IV: 21.2; V: 12.5. PA: I: 19; II: 24; III: 57; IV: ND; V: ND. La distribución relativa de isoformas de FSH con cadenas de oligosacáridos tetra, triantenarias y bisectadas (NR); biantenarias galactosiladas y truncadas (DR) y de tipo híbrido o de alto contenido en manosa (FR) fue diferente en los tres estadios estudiados. En PT predominaron (44%) las isoformas DR; en PM predominaron las isoformas FR (46%) y en PA predominaron las isoformas NR (43%). Estos resultados muestran que durante el desarrollo puberal del varón las isoformas circulantes de FSH modifican: su bioactividad; su contenido en ácido siálico y a medida que la pubertad avanza las isoformas predominantes presentan cadenas de oligosacáridos más completas y de alto grado de ramificación.

- 133. Estudio de la actividad degradante de insulina (ADI) en mitocondrias.** AA Pérez AE Zuazquita, MC Camberos, JC Cresto.

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

Se obtuvieron a partir de hígado de rata las cuatro fracciones mitocondriales: membrana externa (ME), es-

pacio intermembrana (EIM), membrana interna (MI) y matriz (M). Las fracciones solubles EIM y M presentaron la mayor ADI ($22.74 \pm 0.94\%$ y $29.53 \pm 1.48\%$ insulina degradada/h/100 μg proteínas respectivamente). Para caracterizar esta ADI se observó el efecto de varios inhibidores proteolíticos; el perfil de inhibición concorrió con el de la enzima degradante de insulina (EDI), una metaloproteasa citoplasmática considerada la principal responsable de la degradación intracelular de insulina. Para comprobar si se trataba de EDI se realizó un inmunoblotting (IB) utilizando un anticuerpo específico, y se detectó la presencia de EDI en EIM y en menor medida en M. Se efectuó un crosslinking de las cuatro fracciones con 125I-insulina. La autorradiografía mostró en ME una banda específica de 135 kDa, que podría corresponder a la subunidad α del receptor de insulina (RI). Para descartar una posible contaminación con membrana plasmática o citosol se dosó 5'-nucleotidasa y LDH, obteniéndose una contaminación de 5% y 1.5% respectivamente. Controles de IB considerando esta contaminación fueron negativos. Todos los estudios se realizaron con ratas en condiciones basales y luego de la inyección de 2 μg de insulina/100g de peso corporal, sin hallar diferencias. Se puede proponer que la EDI y RI observados son propios de la mitocondria, una organela clave en la acción insulínica.

- 134. La degradación de insulina es regulada por ATP.** MC Camberos, A Pérez, DP Udrisar*, MI Wanderley*, JC Cresto.

*CEDIE, Htal. de Niños R. Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina. *Depto. de Fisiología e Farmacología, Univ. Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.*

En SAIC 1995, fue demostrado que la enzima degradante de insulina (EDI) es inhibida por concentraciones crecientes de ATP, pero no pudo demostrarse si esta acción era directa o mediada por otras proteínas. En esta presentación se demuestra que EDI posee un sitio alostérico de binding de ATP que modifica la actividad enzimática. Se obtuvo EDI citosólica altamente purificada a partir de músculo de rata. EDI fue incubada en presencia de $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$, Cl_2Mg 10 mM, Cl_2Mn 2 mM y cromatografiada en una columna de Sephacryl S200 previamente calibrada con EDI y $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$. Como control se utilizó albúmina bovina. En la zona de EDI se demostró un pico de actividad de ^{32}P . Con EDI purificada se realizó "cross-linking" asociando a $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ durante 60 seg a 30°C e irradiando con luz UV durante 30 min a 0°C . Luego de electroforesis en gel de acrilamida, la autorradiografía mostró una banda específica en 110 kDa, que es el peso reportado para EDI, y que desapareció con dosis 100 mM de ATP. ADP, AMP y GTP 10 mM inhibieron el cross-linking de $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$. Al cuantificar la actividad inhibitoria sobre la degradación de ^{125}I -insulina se observó que $\text{ATP} > \text{ADP} > \text{Ppi} > \text{AMP}$. Vanadato 1 mM también inhibió la reacción, pero insulina 1.7 y 170 μM , no tuvo efecto. Se concluye que el ATP regula la degradación de insulina modulando la actividad de EDI.

- 135. Exacerbación de la diabetes de la rata eSS por la introducción de genes de la línea β .** SM Montenegro, N Figueroa, JC Picena, SM Martínez, MC Tarrés. Facultad de Ciencias Médicas, CIUNR, UNR. Rosario. Santa Fé.

Con el objetivo de evaluar en un modelo murino la influencia del trasfondo genético en la expresión de la diabetes, se generó una línea sintética eSSx β producto del cruzamiento entre las parentales eSS diabética sin sobrepeso y β obesa. Se evaluaron 16 machos eSSx β desde los 4 hasta los 12 meses de edad. Presentaron siempre hiperglucemia de ayuno (4 meses: 151 ± 29 vs eSS: 84 ± 9 mg/dl, $p < 0.001$; 1 año: 265 ± 87 vs eSS: 135 ± 47 mg/dl, $p < 0.001$). La glucemia a los 120 min de sobrecarga glucídica superó desde los 6 meses a eSS (317 ± 78 vs 232 ± 45 , $p < 0.01$; 12 meses: 408 ± 127 vs 312 ± 87 , $p < 0.05$). Al año la insulinemia de ayuno fue mayor en eSSx β (27.04 ± 4.17 vs 17.01 ± 5.7 U/ml, $p < 0.001$) mientras que no difirió significativamente luego de la sobrecarga (30.81 ± 7.73 vs 22.2 ± 5.16 , $p > 0.05$). eSSx β presenta igual n1 de islotes de Langerhans chicos (0.46 ± 0.18 vs 0.59 ± 0.27 , $p > 0.05$) y menor n1 de islotes grandes por campo microscópico (0.11 ± 0.09 vs 0.33 ± 0.21 , $p < 0.05$). El perfil de la biomasa fue diferente a lo largo del tiempo (4 meses: eSSx8 = 351 ± 44 vs eSS = 322 ± 29 g, $p < 0.01$; 6 meses: 437 ± 56 vs 327 ± 32 , $p < 0.001$; 9 meses: 373 ± 67 vs 358 ± 29 , $p > 0.05$; 12 meses: 340 ± 59 vs 364 ± 43 , $p > 0.05$). Se concluye que la introducción de genes β produjo una línea con exacerbación de algunos caracteres de eSS: hiperglucemia de ayuno, mayor intolerancia glucídica y menor masa insular.

- 136. Lesiones tempranas de retinopatía en la línea de ratas eSSx β con diabetes espontánea insulina independiente.** MF Toniolo, N Puig, S Montenegro, S Martínez, MC Tarrés, A Naves.

Facultad de Ciencias Médicas. CIUNR. UNR. Rosario, Santa Fé.

Ante el diagnóstico de retinitis proliferativa en dos machos de la línea sintética eSSx8 con diabetes espontánea insulina independiente efectuado empleando inclusión en parafina y coloración con HE y PAS, se procedió al aislamiento completo de la red vascular retiniana empleando elastasa purificada (40 U/ml). Este método permitió extraer totalmente los tejidos no vasculares. Los capilares retinales se examinaron con microscopio óptica en 8 machos eSSx8 y en 2 testigos no diabéticos, de 12 meses de edad. Los machos diabéticos presentaron elevados valores de glucemia (428 ± 35 mg/dl) mientras que los testigos mostraron valores normales (89 y 78 mg/dl). En los machos eSSx8 se comprobó desaparición de pericitos, canales acelulares y acentuada dilatación de los capilares que habrán perdido los pericitos. Asimismo se visualizó proliferación de células endoteliales y canales hiper celulares dilatados. No se observaron lesiones vasculares en la retina de los animales testigo. Estos hallazgos representan lesiones tempranas de retinopatía diabética y sugieren que el genotipo eSSx8 posee rasgos que, interactuando con la hiperglucemia, hacen posible el desarrollo de lesiones retinales.

- 137. La retinopatía diabética y la actividad del sistema caliceína-cinina en el humor vítreo.** S Hope, MG Marina Prendes, H Benitez, # Ribera, #L Olivera Martins, O Catanzaro.

Cátedra de Fisiología. FFyB. UBA. PROSIVAD-CONICET. #Htal S. Lucía. Buenos Aires.

La retinopatía en la diabetes es una de las lesiones vasculares más comunes, pero su etiología aún no se conoce en profundidad. Existe una correlación hemodinámica entre el sistema vascular retineano y el humor vítreo por excesiva permeabilidad; especialmente cuando hay un adelgazamiento de la membrana basal de los capilares. En este trabajo estudiamos el humor vítreo con el propósito de observar el comportamiento del sistema caliceína-cinina (SCC) en la diabetes. Ratas Wistar machos se inyectaron a los dos días de nacidas, con estreptozotocina (100 mg /kg peso corporal) desarrollando diabetes tipo II. Se las caracterizó a los 85 días mediante el test de tolerancia oral a la glucosa (TTOG). A los cinco meses, a los animales diabéticos (DBT) como a los controles (C) se les extrajo humor vítreo (HV), mediante un vitrectomía. Las determinaciones realizadas fueron: 1-Peso corporal 2-Glucemias 3-Actividad de las caliceínas (Ka) con sustrato cromogénico (S_{220}) en HV expresándose respecto al volumen y al peso corporal. Los resultados obtenidos fueron (DBT vs C): TTOG: (glucemias en mg/dl: basal, 1a h, 2a h) 128 ± 10 , 265 ± 15 , 232 ± 10 vs 100 ± 10 , 210 ± 10 , 85 ± 5 Ka (umoles PNA/ ml.g): 147.03 ± 13.77 vs 82.00 ± 4.72 . Los resultados mostraron un aumento significativo en las Ka del HV de las ratas diabéticas respecto a las controles.

- 138. Evolución del sistema caliceína cinina urinario en ratas diabéticas insulina dependientes.** MG Marina Prendes, SI Hope, C Astudilla, A Domínguez, O Catanzaro.

Cátedra de Fisiología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. PROSIVAD-CONICET.

En trabajos previos hemos comprobado la relación existente entre la patología renal y las caliceínas activas urinarias en ratas diabéticas. El objetivo del presente estudio fue evaluar las mismas serino proteasas en ratas insulina dependientes, tratadas con una dosis de insulina de 3 U/100 g de peso corporal. Se emplearon ratas Wistar macho, los cuales fueron inyectados con una dosis única de streptozotocina de 60 mg/kg de peso corporal. A los dos días, luego de caracterizar a los animales por medio de la determinación de las glucemias basales, se instauró el tratamiento con insulina de depósito (NPH) durante una semana. Se trabajó con tres grupos de animales: controles (C) diabéticos (DBT) y diabéticos con insulina (DBT-I). Las muestras de orina de 24 hs fueron recolectadas empleando jaulas metabólicas. Las determinaciones realizadas fueron las siguientes: pesos, glucemias, diuresis, proteinuria y caliceínas activas urinarias. Los resultados obtenidos fueron los siguientes (C, DBT, DBT-I): -glucemias (mg/dl) 100 ± 10 , 350 ± 10 .

18*,130 +/- 5;- proteinurias (mg/24 hs) vs 55.80 +/- 3.02, 106,80+/-8.02*,64.75 +/- 5.39;caliceínas activas urinarias ([umoles PNA/min/VU].10-4) 5.18 +/- 0.25, 1.43 +/- 0.16*,4.68 +/- 0.22. (*P<0.05 respecto a los C y a los DBT-1).Los resultados obtenidos mostraron una marcada recuperación del sistema caliceína cinina luego de instaurarse la terapia insulínica.

139. Autotransplante de Islotes Impuros Porcinos en el Hígado. M Barbich, SH Hyon, J Mullen, P Sorroche, M Vieiro, P Argibay.

Unidad de Medicina Experimental Hospital Italiano de Buenos Aires.

El objetivo de este trabajo fue evaluar las ventajas e inconvenientes del hígado como receptor de una suspensión de islotes impuros en un modelo experimental porcino. Nueve cerdos mestizos fueron pancreatectomizados y auto-transplantados con una suspensión de islotes impuros (71075 IE±50068) obtenidos por digestión enzimática (colagenasa, 2 mg/ml, a 37°C, durante 20 minutos). La suspensión fue infundida en la vena porta. Se determinaron glucemias, hepatogramas y MEGX basales y semanales. Los animales fueron sacrificados al mes y los hígados evaluados por hematoxilina-eosina, tricrómico de Mason e inmuno-histoquímica. Dos de los nueve animales fallecieron por trombosis portal. En el resto, las glucemias estuvieron elevadas las dos primeras semanas post-transplante (basal 93±23 mg%, 205±125mg%, 146±42mg% ,1ra. y 2da. semanas) , normalizándose posteriormente (123±71mg%, 106±23mg%, 3ra. y 4ta. semanas). Ninguno de los animales requirió insulina. A las 24 h se observó transitoriamente una caída en los valores de MEGX y un aumento de TGP y TGO. El hígado mostró arquitectura conservada, con áreas de dilatación sinusoidal, edema y trombos de acúmulos celulares con gránulos en su interior. Las tinciones para insulina y citoqueratina fueron positiva.Se pone de manifiesto la aptitud del hígado como sitio receptor del autotransplante de células acinares e insulares, permitiendo la normalización de las glucemias en animales pancreatectomizados. Sin embargo, este procedimiento tiene asociadas complicaciones hepáticas agudas.

140. Regulación de la captación de 2-deoxiglucosa por células FRTL-5. D Silberschmidt, MA Pisarev, L Krawiec, LV Bocanera, GJ Juvenal, M Ginzburg, G Beraldi, G Brenta.

División Bioquímica Nuclear, CNEA, CONICET y Universidad de Buenos Aires.

La tiroides posee una escasa reserva de glucógeno, y depende de la captación de glucosa para su función. En trabajos previos mostramos un efecto aditivo entre TSH e insulina al estimular la captación de 2-DOG en las células FRTL-5. En los presentes estudios se observó un efecto aditivo entre TSH e IGF-1, reproduciendo este último el efecto de insulina (Control 87±14 pmoles/mg,

TSH 383±38, IGF-1 221±26, TSH+IGF-1 655±91). La forskolina reprodujo el efecto de la TSH. La acción de la insulina fue inhibida por staurosporina, sugiriendo que la PKC está involucrada en este proceso. Los ésteres de forbol (PMA) aumentaron la captación de 2-DOG y produjeron un efecto aditivo con TSH. El KI 0,01 mM causó una inhibición del 59% sobre la captación de 2-DOG estimulada por TSH. Esta inhibición fue reproducida por 6-iodo-delta-lactona (IL-delta) 0,01 mM, 29% y por TGF-β (58%). Bajo condiciones similares tanto IL-delta como TGF-β inhibieron la captación de iodo (control 258±50 cpm/mg prot, TSH 2414±364, TSH +IL-delta 1443±54, TSH +TGF-β 5 ng/ml 1534±234) Conclusiones: La captación de 2-DOG en FRTL-5 es estimulada por 2 vías, con aditividad de sus correspondientes efectores. Además, nuestros resultados sugieren un rol de la iodolactona y del TGF-β en la regulación de la captación de 2-DOG.

141. ¿Existe un inhibidor de la organificación en los cultivos primarios de tiroides bovina? L Krawiec, LV Bocanera, MA Pisarev, D Silberschmidt, GJ Juvenal, M Ginzburg, G Beraldi, G Brenta

CONICET, Universidad de Buenos Aires y CNEA

Los cultivos primarios de tiroides bovina, en confluencia, no organifican iodo. Estudiamos las posibles causas de la pérdida de dicha función. Se utilizaron cultivos primarios bovinos, en crecimiento hasta confluencia, en los cuales se aisló el sobrenadante de 105000xg de homogeneizados totales en buffer fosfato 0.1 M, KI 0.1 mM, pH 8.0. Asimismo se extrajo la peroxidasa (TPO), con tritón X-100 del precipitado de 105000xg de tiroides frescas homogeneizadas en el mismo buffer. La actividad de TPO se midió por iodación de tirosina, siendo el valor control: 103998±5278 dpm/mg prot. La adición de sobrenadante de 105000xg, de cultivo en confluencia (equivalente a 0.25 mg de proteína) redujo la actividad un 48% a 54024±3257 dpm/mg de prot.(p<0.001). El inhibidor es termoestable, ya que 15 min.a ebullición no altera su efecto. La cinética de inhibición es de tipo competitiva. La adición de tiroglobulina no inhibió a la TPO fresca, demostrando que no es la tiroglobulina del sobrenadante la que reduce la iodación de la tirosina. La correlación entre organificación e inhibición de TPO muestra que la primera disminuye desde 20% el 3° día hasta 2% el 14° día y la inhibición de TPO aumenta desde 28% hasta 53% en igual período. En conclusión: el citosol de los tirocitos en cultivo contiene un inhibidor de TPO. Esto explicaría la ausencia de organificación en los cultivos primarios en confluencia.

142. Cambios Bioquímicos y Morfológicos en Pulmón de Rata Hembra después de la Castración. NN Gómez, MS Ojeda, E Gil, R Azpiroz, L Scardapane, MS Giménez.

Cátedras de Anatomía y Fisiología y Qca Biológica Patológica. Univ. Nac. de San Luis.

Comprobamos que la falta de andrógenos produce cambios bioquímicos y morfológicos en el pulmón de ratas macho castradas, quisimos ver si la privación de estrógenos producía el mismo efecto. Se trabajó con ratas Wistar que se dividieron en dos grupos: castradas (I) y controles (II). A los 21 días de castración los animales fueron sacrificados y los pulmones extraídos, lavados y secados. Se extrajeron los lípidos por el método de Folch y col. Los fosfolípidos (FL) fueron separados por TLC y las bandas visualizadas con iodo. El fósforo inorgánico se determinó por el método de Rouser y col. Se realizó la técnica histológica para la microscopía óptica. Los resultados muestran lípidos totales y proteínas en grupo (I): $13.3\text{mg} \pm 0.5$, $31.8\text{mg/g tej.} \pm 1.1$ respectivamente, grupo (II) $17.9\text{mg} \pm 0.8$, $41.2\text{mg/g tej.} \pm 1.5$ con un $p < 0.01$ en ambos casos. Los valores porcentuales de cada especie en relación a FL totales de PC, PI, PS, y PE disminuyen con un $p < 0.01$, LPC y PG aumentan con un $p < 0.05$, mientras que esfingomielina (Sph) no se modifica, (Test de Student). El estudio histológico mostró destrucción de la citoarquitectura alveolar y un aumento del tejido conectivo, fibras colágenas y fibroblastos. Infiltración linfocitaria. El sistema bronqueolar toma el aspecto de un enfisema pulmonar. Se puede concluir que la falta de estrógenos provocaría cambios en el contenido lipídico y proteico del pulmón, como así también en su estructura tisular.

143. Estudio del complejo albúmina (A) y calcio con A normal y de pacientes con lepra lepromatosa. MC Vidal, H Abrazon, C Gatti, RC Puche.

Laboratorio de Biología Ósea, Fac. de Medicina y Cátedra de Fisiología, Fac. de Bioquímica, UNR. Rosario, Santa Fe.

Los pacientes de lepra lepromatosa (LL) tienen hipocalcemia con calcio inicial y proteínas totales normales. La hipocalcemia no se debe a fallas de absorción, actividad paratiroidea o estado ácido-base. El análisis de los resultados de la titulación de protones a temperatura, pH y fuerza iónica controladas y concentraciones entre 0 y 100 mM Ca demostró que la A normal tiene 12^{11} sitios de unión/mol, con una constante de asociación de 108^{17} L/M. Para la A LL los valores fueron 12^{11} sitios/mol y 51^{15} L/M. El colorante carbocianina (stain-all) se fija como el Ca en la A. El agregado de A a la solución de colorante reduce la absorbancia máximas (535 y 575 nm). En condiciones standard, la diseminación es del 20% con la A LL y de 47% con A normal. El agregado de Ca revierte el efecto anterior: las concentraciones necesarias son: 1.66 y 3.35 mM para A LL y A Control, respectivamente. Estos resultados sugieren que la afinidad por el Ca de la Albúmina de pacientes LL es significativamente menor que la de sujetos sanos.

144. Un estudio de morbi-mortalidad de la fractura de cadera J. Cipitria, MM Sosa, RC Puche, R Bocanera.

Centro de Estudios del Climaterio, Cátedra de Ginecología, Facultad de Medicina, Rosario. Santa Fe.

Este trabajo presenta un examen retrospectivo (1979-1995, de 200 personas (154 mujeres y 46 hombres), 50-101 años de edad que recibieron atención médico-quirúrgica por fractura de cadera. La supervivencia se investigó con el método de Kaplan-Meier. La diferencia en la supervivencia asociada al sexo fue evaluada con el log-rank test. No se observaron diferencias significativas en la edad de los pacientes fracturados ($\chi^2=3.8$, $P=0.43$). 11/154 mujeres y 6/46 hombres fracturados fallecieron en los 3 meses siguientes a la cirugía ($P=0.23$), a partir de este momento fallecieron a una tasa anual de 4%. No se observaron diferencias significativas asociadas al sexo respecto de la evolución: «buena» en el 80%, 8.5% «regular» y 5.5% «mala». No se observaron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia ($P_2=0.002$, $P=0.96$). La mediana de la supervivencia no difirió entre hombres y mujeres (7.7 y 6.1 años). Estos resultados difieren del informe de Miller, ampliamente difundido, sobre la morbi-mortalidad de la fractura de cadera («buena» evolución: 51%; al año: mortalidad 27%, pacientes no-ambulatorios 22%).

145. Efectos de los Productos de Glicosilación Avanzada de proteínas (PGA) sobre el crecimiento de osteoblastos en cultivo. AD McCarthy, SB Etcheverry, L Bruzzzone, AM Cortizo.

Cátedra de Bioquímica Patológica y División Química Analítica, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Calle 47 y 115, (1900) La Plata. Buenos Aires.

En una reacción no enzimática, la glucosa puede unirse reversiblemente a grupo amino libres de una proteína, formando así productos de Amadori; estos compuestos pueden luego derivar irreversiblemente en productos de glicosilación avanzada de proteínas (PGA). Este trabajo estudia el efecto de los PGA sobre el crecimiento de dos líneas celulares óseas en cultivo. Se incubaron las células de fenotipo osteoblasto de rata (UMR106) y de ratón (MC3T3E1) con concentraciones crecientes de PGA de Albúmina Sérica Bovina obtenida in vitro (PGA-ASB) o de ASB control, por diferentes períodos de tiempo. Al cabo de las incubaciones, se estimó la proliferación celular (por el método del Cristal Violeta) y la diferenciación celular (midiendo la actividad específica de Fosfatasa Alcalina). Con incubaciones de hasta 48 horas, se evidenció un desacoplamiento entre la proliferación y diferenciación celular, dependiente de la dosis de PGA-ASB. A partir de las 72 horas de incubación, PGA-ASB indujo una disminución en ambos parámetros. Estos resultados sugieren que los PGA tienen un efecto directo, dependiente del tiempo y de la dosis, sobre la regulación del crecimiento de los osteoblastos. Así, los PGA inducidos por la hiperglucemia crónica podrían regular el recambio óseo.

NEUROCIENCIAS I

- 146. Aumento de la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) en el hipotálamo medio basal (HMB) durante la sepsis.** S Díaz, C Mastronardi, A Lomniczi, G Canteros, V Rettori, SM MacCann (CEFYBO- CONICET) Buenos Aires.

Hemos encontrado previamente que la inyección de LPS aumenta la actividad de la NOS en el HMB de rata. En el presente trabajo se estudiaron los efectos de drogas antiinflamatorias esteroideas y no esteroideas sobre la actividad de la NOS en HMB. Por otra parte se buscó dilucidar cuál de las isoformas (nNOS calcio dependiente y/o iNOS calcio independiente) sería inducida durante una inflamación aguda. Se inyectó LPS (2.5 mg/kg peso corporal (p.c.) i.v. con clonixinato de lisina (CL) (40 mg/kg p.c.) i.p o dexametasona (DEX) (1mg/kg p.c.) i.p (6 animales por grupo). Como la arginina es convertida en NO y citrulina por la NOS en cantidades equimolares, se midió la formación de citrulina marcada a partir de [¹⁴C]arginina como un parámetro de la actividad de la NOS. Para diferenciar iNOS de nNOS se incubaron las muestras de HMB con y sin calcio. La actividad enzimática de la NOS está expresada en pmoles NO/min.x HMB. Actividad de la NOS total: Control: 9.98 ± 0.53 , LPS: 12.59 ± 0.37 ($p < 0.05$), LPS+CL: 12.78 ± 0.64 ($p < 0.05$), LPS+DEX: 10.83 ± 0.37 (NS). Actividad de la iNOS: Control: 0.28 ± 0.026 , LPS: 0.74 ± 0.088 ($p < 0.05$), LPS+DEX: 0.36 ± 0.044 (NS). En la inflamación aguda aumenta la actividad de la iNOS en el HMB que puede ser inhibida por Dex y no por CL. Por lo cual intervenciones farmacológicas en la regulación de la iNOS cerebral podrían representar una nueva estrategia en el tratamiento de la sepsis.

- 147. Síntomas y efectos colaterales neurológicos durante la primera hospitalización por trastornos esquizofrénicos.** NM Zelaschi, JL Rodríguez, F Archuby, S Pujol, M Semasendi.

Facultad de Ciencias Médicas.(UNLP).Calle 60 y 120.1900 La Plata. Buenos Aires.

Introducción: previamente hemos presentado información sobre los efectos de tratamiento crónico con antipsicóticos (AP). Aquí mostramos evidencia comparativa de los efectos psicofarmacológicos, ante una primera exposición a las drogas. Método: Se estudiaron 82 pacientes, durante la primera hospitalización por esquizofrenia (Criterio diagnóstico DSM IV). Se usaron las siguientes escalas psicométricas para medir variables: Simpson y Angus (SEP), Movimientos Anormales (AIMS), Síntomas Positivos (SP) y Negativos (SN) [PANSS]. Las dosis de AP, fueron transformadas a equivalentes de clorpromazina en mg/día. Resultados: sólo se observó una tendencia levemente significativa a favor de una edad mayor en las mujeres (M) en relación a los hombres (H) [M: $n = 33$, $x = 32.09$, $DS = 10.83$; H: $n = 49$, $x = 26.93$, $DS = 7.24$, $p = .0162$]; no existieron diferencias significativas entre sexos en las variables medidas. Se utilizó un análisis de cluster (ligamento promedio no ponderado por pares de grupos 1-r de Pearson) y una

matriz de correlaciones múltiples, para evaluar similitudes y asociaciones. El fenograma muestra una mayor proximidad entre los síntomas negativos (SN) de la enfermedad (escasez de lenguaje, apartamiento) con la psicopatología general (PP) y luego con los síntomas positivos (SP) [delirios, trastornos paranoides (agrupamiento I)]; los movimientos diskintéticos bucolinguales (BL) y la Akatisia (AK) se hallan también próximos entre sí (agrupamiento II) y los agrupamientos I y II se aproximan (distancia de ligamiento 0.7). Se halló correlación positiva significativa entre SN y SP con PP ($r = .06909$, $p = .000$ y $.4702$, $p = .001$, respectivamente) y entre BL con AK ($r = .3496$, $p = .017$). SP y PP se correlacionaron con AK ($r = .3369$, $p = .022$ y $.2954$, $p = .046$ respectivamente. Conclusiones: Durante el primer episodio de esquizofrenia (PE), los SP y PP predicen la aparición de AK. No siendo los síntomas edad o dosis-dependiente, se fortalece la hipótesis de una vulnerabilidad individual para desarrollar un patrón particular de síntomas psicóticos junto a complicaciones neurológicas específicas durante el PE.

- 148. Efecto del acetato de desoxicorticosterona (DOCA) sobre el apetito salino y la inmunorreactividad de arginina-vasopresina (AVP) en el hipotálamo de la rata.** FE Saravia, MG Ferrini, CA Grillo, AE Lima, AF De Nicola.

IByME-CONICET-Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Los mineralocorticoides (MC) juegan un papel importante en la regulación del apetito salino y el desarrollo de la hipertensión arterial. Los mecanismos centrales involucran la interacción de los MC y neuropéptidos como AVP, que se expresa en el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo. La administración de DOCA (10mg/día) durante 21 días (en días alternos), a ratas con acceso tanto a agua como a solución salina, desarrolló el apetito salino y aumentó la presión arterial. Mediante técnicas de inmunocitoquímica y un analizador computarizado de imágenes observamos una disminución significativa del número de células AVP positivas en el PVN (control (CT) 37.2 ± 6.2 vs DOCA (DO) 19.1 ± 2.9 $p < 0.05$) y del área celular (CT $166.2 \pm 10.6 \mu m^2$ vs DO $128.0 \pm 3.9 \mu m^2$ $p < 0.005$). La intensidad de la tinción expresada como ILIGV y como ILIGV/area no varió significativamente. La respuesta a DOCA fue diferente cuando los animales solo bebían solución salina: tanto el área celular (CT $171.3 \pm 11.8 \mu m^2$ vs DO $208.7 \pm 8.9 \mu m^2$ $p < 0.05$) como la intensidad de la inmunorreactividad por AVP (ILIGV CT 73.3 ± 8.9 vs DO 102.6 ± 3.4 $p < 0.005$ e ILIGV/area CT $.424 \pm 0.02$ vs DO $.492 \pm 0.02$ $p < 0.05$) aumentaron significativamente. En conclusión, los datos sugieren que el sistema vaso-presinérgico en el PVN es modulado por MC e ingesta salina, variando los efectos de acuerdo al modelo experimental.

- 149. Anormalidades eléctricas cerebrales asociadas a defectos de aprendizaje en ratas expuestas a plomo a baja dosis.** AA Yorío, AP Lemoine, JC Brum, ET Segura.

Laboratorio de Biología del Comportamiento. IBYME. CONICET. Buenos Aires.

Son objetivos del presente trabajo examinar efectos de exposición prologada en ratas sobre open-field (OF), evitación pasiva (EP), potencia EEG (pEEG) y potenciales relacionados con eventos (PRE). Fueron estudiados 4 grupos de 6 ratas macho Sprague Dawley que recibieron en agua de bebida: acetato de plomo 26 mM, 13 mM, 1 mM y agua corriente. Al sexto mes se practicaron las pruebas, registros y determinaciones de plomo en sangre (Pbs) y tejidos (Pbt). Los resultados mostraron diferencias significativas en OF (deambulacion interna, $F=4.32$, $P<0.05$); EP (latencia al step-through, $F=6.23$, $P<0.05$); pEEG (banda theta, $F=8.2$, $P<0.01$) y PRE (latencia componente positivo tardío, $F=7.92$, $P<0.01$). Se evidenciaron correlaciones entre Pbt y pEEG theta ($r=0.49$, $P<0.05$) y entre latencias EP y PRE ($r=0.57$, $P<0.02$). Se concluye que niveles tisulares de plomo se asocian a anormalidades conductuales y de la actividad eléctrica cerebral relacionadas.

150. Alteraciones electrofisiológicas e histológicas en nervio periférico en ratas expuestas a plomo a baja dosis. AA Yorio, ET Segura.

Laboratorio de Biología del Comportamiento. IBYME. CONICET. Buenos Aires.

El presente trabajo tiene por objeto estudiar la influencia de diferentes dosis de intoxicación crónica por plomo en ratas sobre prueba de locomoción (PL), detección electromiográfica (EMG), velocidades de conducción nerviosa (VCN) y microscopía óptica de nervio ciático (MOC). Fueron estudiados 4 grupos de 6 ratas macho Sprague Dawley que recibieron en agua de bebida: acetato de plomo 26 mM, 13 mM, 1 mM y agua corriente. Al sexto mes se realizaron los registros y los animales fueron sacrificados para determinaciones de plomo sanguíneo (Pbs) y tisular (Pbt) e histología. Los resultados evidencian diferencias significativas en PL (distancia interdigital, $F=4.29$, $P<0.05$); EMG (área de potenciales de unidad motora, $F=4.84$, $P<0.05$); VCN (latencia del potencial de acción compuesto muscular tardío, $F=7.11$, $P<0.05$), y MOC (densidad de fibras, $F=6.79$, $P<0.05$). Se verificaron correlaciones entre Pbt y latencia potencia tardío VCN ($r=0.62$, $P<0.01$) y densidad de fibras MOC ($r=0.55$, $P<0.02$). Se concluye que la exposición prolongada al plomo produce en la rata alteraciones clínicas, electroneurofisiológicas e histológicas relacionadas.

151. Inervación del ovario como modelo de integración Neuroendocrina periférica. Z Sosa de Gil, G Pinamonti, M Lafarque, L Aguado.

Lab. de Biología de la Reproducción (LABIR). Universidad Nacional de San Luis.

Se presenta un sistema *in vitro*: Ganglio Celiaco-Nervio Ovárico Superior (NOS)-Ovario para el estudio de la integración nerviosa y endocrina a nivel periférico durante el ciclo estral. A ratas Holtzman de 90 días en Diestro II, bajo anestesia, se les extrae el sistema Gan-

glio-NOS-Ovario y entre 1-2 min. después se coloca en celdas separadas el ovario y el ganglio, se estabiliza 30 min. en buffer Krebs-Ringer-glucosa (0,1mg/ml)-albúmina (0,1mg/ml), en baño metabólico. Se incuba el ganglio en presencia de Acetilcolina (Ach), Atropina (At), Hexametonium (Hex), Noradrenalina (NA), Propranolol (Prop), y Fentolamina (Fa) (10^{-6} M y 10^{-7} M en ácido ascórbico) y se determina la concentración de Progesterona (P) en el líquido de incubación de la celda ovárica, a diferentes tiempos (30, 60, 120, 180 min.). La estimulación ganglionar con Ach y NA disminuye la secreción de P ($p<0.001$) y con Hexametonium, Propranolol y Fentolamina incrementa ($p<0.001$), indicando que la estimulación ganglionar, modificaría la función ovárica. Los resultados muestran que el efecto estimulador adrenérgico es tanto α como β , siendo mayor el de tipo β y la colinérgica afectaría receptores nicotínicos. Además muestra al Ganglio Celiaco como un relevo sináptico entre las vías centrales y las que llegan al ovario vía NOS.

152. El Nervio Ovárico Superior (NOS) y su relación con un sistema de integración Inmuno-Neuroendocrino Periférico en rata. M Forneris, L Oliveros, M Carrasco, L Aguado.

Lab. Biología de la Reproducción. Univ. Nac. de San Luis. Chacabuco 917-5700 San Luis.

Se conoce que existe interacción entre los sistemas Neuroendocrino e Inmune y que bazo y ovario están inervados por fibras del ganglio celiaco. Para mostrar una posible relación funcional entre la inervación del ovario y el bazo se determinó el efecto de líquidos de cultivos de 24 h. de linfocitos de bazo (L) sobre la liberación de Progesterona (P) por ovarios de ratas controles y con corte de NOS incubados 3h a 37°C y 95% O_2 -5% CO_2 . Grupos: I-(L) de ratas de 30 y 60 días (d) sobre ovarios de 30 y 60d; II-(L) de ratas de 30d sobre ovarios con corte de NOS a los 28d y sacrificio al d 30; III-(L) de ratas de 60d sobre ovarios con corte de NOS a los 50d y sacrificio al d 60, y se midió el N° de receptores β adrenérgicos(R β) de los linfocitos como fentomoles cianopindolol unido/mg proteína; IV-(L) de ratas con corte de NOS a los 50d, sacrificadas a los 60d, sobre ovarios de ratas controles de 60d. Se usó Test de Student. Los ng P/mg ovario en: I, aumentan respecto a incubaciones con medio solo (0.3 ± 0.01 vs 0.075 ± 0.005 , $p<0.001$) y (1.2 ± 0.06 vs 0.2 ± 0.08 , $p<0.001$); II, aumentan respecto al control (0.6 ± 0.003 vs 0.3 ± 0.01 $p<0.001$); III, no se modifican pero aumenta el NE de R β de linfocitos (65 ± 3 vs 161 ± 3 , $p<0.001$); IV, disminuyen (0.7 ± 0.03 vs 1.2 ± 0.06 , $p<0.001$). Se sugiere que el corte del NOS modifica la secreción de los linfocitos llevando a cambios en la liberación de P desde el ovario.

TUMORES III

153. Factores presentes en el órgano blanco de la metástasis favorecen la sobrevivencia de células tratadas con quimioterápicos. V Ladedá, L Puricelli, E Bal de Kier Joffé.

Area Investigación, Instituto de Oncología «A.H. Roffo», Buenos Aires.

La sobrevida celular está regulada por factores presentes en el microambiente extracelular. En trabajos previos hemos demostrado que factores solubles presentes en pulmón normal (PN), órgano blanco de la metástasis, estimulan la proliferación y migración de células tumorales mamarias murinas in vitro, así como el crecimiento tumoral y metástasis in vivo. Nuestro objetivo es estudiar in vitro si el tratamiento con PN protege células tumorales de la apoptosis inducida por drogas quimioterápicas como la doxorubicina (DOX). Se estudió el efecto citotóxico de la DOX en un rango de 500 a 2000 nM sobre monocapas de células LMM3, tratadas durante 2 hs con la droga y luego cultivadas en medio sin suero. A las 24 hs se determinó una DC50 de 800 nM. Cuando la células tratadas con DOX continuaron en cultivo en presencia de PN (20% v/v en MEM), se observó un significativo aumento de la sobrevida celular hasta las 72 hs postratamiento. Por tinción con naranja de acridina se determinó que, a las 48 hs post-tratamiento, sólo un 11% de las células cultivadas en presencia de PN presentaban signos de apoptosis, versus el 75% de las células tratadas sólo con la droga. La electroforesis del ADN de las células tratadas con DOX mostró el patrón característico de fragmentación de muerte por apoptosis. Estos resultados sugieren que los factores presentes en el órgano blanco de la metástasis capaces de favorecer la sobrevida de células tumorales tratadas con drogas quimioterápicas.

- 154. Fosfatasa alcalina total y de alto peso molecular en plasma de pacientes con cáncer: su importancia en la detección de metástasis.** A Sembaj, M Yorio, C Carriazo, J Moreno Barral.

Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Los tumores óseos malignos van acompañados por altos niveles de actividad de fosfatasa alcalina soluble ósea (FAO) en plasma. En los tumores hepáticos se incrementan las actividades de fosfatasa alcalina soluble y ligada a membrana de origen hepático (FA-Mr). El objetivo de este trabajo es estudiar la correlación entre los niveles de las distintas actividades de fosfatasa alcalina presentes en plasma de pacientes neoplásicos para establecer un patrón que nos permita diagnosticar la presencia de metástasis. Se estudiaron 58 controles normales, 32 pacientes con neoplasias sin metástasis y 58 con metástasis óseas y/o hepáticas. La evaluación clínica se realizó mediante: tomografía axial computada y ultrasonografía abdominales, radiografía, biopsia y centellografía ósea. La actividad enzimática se determinó con paranitrofenilfosfato como sustrato en buffer DEA pH 9,4 y se midió por espectrofotometría a 405 nm. La FAO se determinó por precipitación con lectina de

germen de trigo y la FA-Mr se cuantificó luego de ultracentrifugación a 100.000g y resuspensión del pellet en Tris HCl pH 7,2. Se realizó una clasificación de los pacientes según un índice obtenido combinando las actividades de fosfatasa alcalina total, FAO y FA-Mr. Se calculó su especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y se estimó su capacidad predictiva en base al teorema de Bayes. **Resultados y Conclusiones:** 1) El índice permite discriminar entre pacientes con neoplasia sin metástasis y pacientes con metástasis, lo que no es posible con ninguna de las variables en forma independiente. 2) Las propiedades del índice son: a) especificidad 87%, b) sensibilidad 82,7%, c) valor predictivo positivo 94%, d) valor predictivo negativo 80%, e) diagnósticos dudosos 4%. 3) La probabilidad de que haya metástasis cuando el índice da positivo es 93% (Teorema de Bayes).

- 155. Efecto de la desmopresina (dDAVP) y péptidos relacionados sobre el comportamiento in vitro de células de carcinoma mamario murino.** DF Alonso, G Skilton, HG Farina, MS De Lorenzo, DE Gomez.

Laboratorio de Oncología Molecular, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes. Buenos Aires.

Recientemente se reportó una acción antime-tastásica de la dDAVP (1-deamino-8-D-arginina vasopresina) sobre las etapas tempranas de la colonización pulmonar en un modelo experimental de cáncer mamario. Hemos estudiado los efectos de las hormonas vasopresina y oxitocina, y de sus respectivos análogos sintéticos dDAVP e isotocina, sobre el comportamiento in vitro de la línea F3II de carcinoma mamario, cedida por el Area Investigación del Instituto de Oncología A.H. Roffo. La proliferación se evaluó cultivando $5-7 \times 10^4$ células F3II en MEM con o sin suero fetal bovino (1%), en presencia o ausencia de los agentes en estudio (10 nM-1 mM) y realizando recuentos cada 24 horas. Los efectos sobre la secreción de uroquinasa, una proteasa clave en invasión y metástasis, se estudiaron en medios condicionados libres de suero mediante caseinólisis radial y zimografía. Vasopresina y dDAVP (1 mM) estimularon la proliferación en ausencia de suero, acortando el tiempo de duplicación poblacional en fase logarítmica (Control: 106 ± 15 , Vasopresina: 40 ± 6 , dDAVP: 43 ± 2 horas; $p < 0.001$ ANOVA), mientras oxitocina e isotocina ejercieron un moderado efecto inhibitorio. La mayor proliferación de F3II provocada por vasopresina y dDAVP, con la consecuente confluencia de los cultivos, se asoció con una menor secreción de uroquinasa (Control: 2.23 ± 0.2 , Vasopresina: 0.86 ± 0.1 , dDAVP: 1.06 ± 0.1 UI/10⁶ células/24 horas; $p < 0.001$ ANOVA). Los resultados indican que vasopresina y dDAVP podrían modular el comportamiento de las células metastásicas F3II.

156. **Hallazgos clínicos en pacientes con retinoblastoma (Rb).** M Abdala, J Herrera, I Szijan, A Fandiño, J Manzitti, C Barreiro.

Servicios de Genética y Oftalmología, Hospital «Juan P Garrahan» y Neurobiología Molecular, Hospital de Clínicas «José de San Martín. Buenos Aires».

El RB es el tumor maligno más frecuente en menores de 5 años. Hereditario en el 40% y no hereditario en el 60% de los pacientes. La frecuencia es de 1/20.000 nacidos vivos. El objetivo del presente trabajo es establecer las características clínicas, poblacionales y cromosómicas de 86 pacientes de 82 familias con Rb bilateral(B) y unilateral(U) vistos en el servicio de genética en el término de 1 año. Solo 14 pacientes tenían historia familiar positiva. Al momento de la consulta el 59.4% correspondió al 1o año de vida. La relación varón/mujer es 52.3:47.7. El 59.9% proceden de la prov. de Bs. As. y de Cap. Fed. El 64% son RbB y el 36% RbU. Dos niños con fenotipo anormal y retardo madurativo (RM) presentaron en su cariotipo una delección 13q14. El resto tenía fenotipo y estudio citogenético normal. La leucocoria fue el hallazgo oftalmológico más común. El 84.9% se enuclearon. Sobreviven el 98.8%, con ceguera parcial el 96.5% y complicaciones el 13%. Concluimos que es necesario resaltar la importancia del diagnóstico precoz para evitar la morbilidad infantil de este tumor. La búsqueda de dismorfas y RM en los niños afectados y la pesquisa de tumores en las familias de alto riesgo, investigando en los mismos alteraciones cromosómicas y/o moleculares, identificando los portadores del gen a los fines de un asesoramiento genético adecuado.

157. **Feocromocitomas pediátricos. Estudio histopatológico de factores pronósticos.** M Venara, R Sánchez Marull, S Maglio, M Gamboni, M Barontini, H Chemes.

CEDIE, Hosp Niños R. Gutiérrez; Laboratorio de Patología, Sanatorio Mater Dei, Buenos Aires.

Se analizaron retrospectivamente 16 feocromocitomas provenientes de 12 pacientes para estudiar factores pronósticos. Se revieron datos clínicos e histología; se estudió la ploidía con analizador de imágenes en disgregados celulares obtenidos de tacos de parafina y la reactividad para el antígeno de proliferación celular PCNA y para el factor supresor de tumores p53. Fueron 9 varones y 3 mujeres con edad mediana de 10.5 a (4-14a), tumor bilateral en 5 y familiar en 2. El tiempo de seguimiento fue $\times 8.7a$ (1-26a). Ninguno presentó metástasis; hubo recurrencias tumorales en 3. Los resultados de los factores pronósticos según la evolución clínica fueron: Pleomorfismo (Pl) leve: no recurrentes (nR) 18%, recurrentes (R) 0%; Pl moderado: nR 27%, R 80%; Pl severo: nR 55%, R 20%; necrosis: nR 45%, R 40%; invasión vascular: nR 18%, R 20%; invasión capsular: nR 18%, R 0%; aneuploidía: nR 37.5%, R 50%; tetraploidía: nR

62.5%, R 50%; no hubo ningún tumor diploide. Índice mitótico (NEde mitosis/50 campos gran aumento) (x): nR 2.8, R 1.4; PCNA (x): nR 4.4%, R 0.4%; reactividad negativa para p53 en todos. En este grupo pediátrico predominó el contenido tumoral tetraploide y aneuploide, sin embargo la ploidía ni los restantes factores estudiados fueron predictivos para la evolución tumoral.

GASTROENTEROLOGIA II

158. **Liperoxidación y actividad Superóxido Dismutasa en la fase de iniciación de la regeneración hepática.** C Scapini, MC Carrillo, C Favre, J Monti, C Carnovale.

Instituto de Fisiología Experimental-CONICET. Fac. Cs. Bioquímicas. UNR. Rosario. Santa Fé.

Objetivo: Estudiar el nivel de liperoxidación (LPO) en distintas fracciones subcelulares hepáticas y la actividad antioxidante durante la fase de iniciación de la regeneración hepática luego de una hepatectomía parcial. **Materiales y métodos:** 3 grupos (n=5) de ratas Wistar machos adultas: Control, Sham y Hepatectomizado (HP 65%) fueron sacrificados a las 6, 15 y 24 hs luego de la operación y se obtuvieron las siguientes fracciones: nuclear (N), mitocondrial-lisosomal (ML), citosólica (C) y microsomal (M). Se determinó LPO en homogenado total y en cada fracción cuantificando las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (expresado en nmol de malondialdehído-MDA-/ 100 mg proteína). En la fracción C se determinó la actividad superóxido dismutasa (SOD) por reducción del ferricitocromo c. El proceso de regeneración fue evaluado por incorporación de [3H]-timidina al ADN. **Resultados:** LPO: en homogenado total aumentó significativamente ($p<0.05$) 58% en Sham-6 hs, 115% en HP-6 hs y 219% en HP-24hs (Control: 72 ± 19). En M se observó un incremento significativo ($p<0.05$) del 106% en el grupo HP-6hs (Control: 43 ± 4 ; Sham: 51 ± 6). En ML hubo un aumento significativo ($p<0.05$) del 85% en los grupos Sham-6hs y HP-6hs (Control: 88 ± 15). SOD: Se observó un aumento significativo ($p<0.05$) del 142% en Sham-6hs y del 79% en HP-6hs (Control: 5.3 ± 0.5 U SOD/mg prot). A las 24 hs Sham y HP presentaron un aumento del 145%. **Conclusiones:** 1) Aumenta la producción de radicales libres en la fase de iniciación de la regeneración dado el aumento de LPO en homogenado de HP-6hs. 2) El incremento de SOD a las 6 hs sería una respuesta antioxidante frente al aumento de LPO.

159. **Putrescina Disminuye CYP3A4 Durante La Regeneración Hepática En Ratas.** C Favre, JA Monti, C Scapini, CE Carnovale, MC Carrillo.

Instituto de Fisiología Experimental-CONICET. Facultad de Bioquímica. UN Rosario. Santa Fé.

Se ha descrito una disminución selectiva de algunas isoenzimas del citocromo P450 (CYP) durante la regeneración hepática. El mecanismo no ha sido aclarado. En un resumen anterior hemos presentado resultados que indican que la poliamina putrescina, esencial en el proceso regenerativo, estaría involucrada en la disminución del CYP total luego de una hepatectomía parcial. En este trabajo se analiza el comportamiento de la isoenzima constitutiva más importante del sistema P450, CYP3A4, durante la regeneración, tras una inyección única de putrescina, y en condiciones donde se inhibe la síntesis de putrescina con GABA. **Métodos:** Se usaron cinco grupos de ratas ($n=4-5$): *sham*, hepatectomizadas (65%), hepatectomizadas pretratadas con GABA, *sham* pretratadas con GABA y ratas tratadas con putrescina (18.5 pg/g). La regeneración se monitoreó siguiendo la incorporación de [3 H] timidina al DNA hepático. Los animales fueron sacrificados 48 h luego de la cirugía. Se midió en muestras de microsomas de hígado la actividad nifedipina oxidasa asociada a CYP3A4 por HPLC y se corroboraron los niveles de su apoproteína mediante análisis de Western Blot. **Resultados:** La actividad nifedipina oxidasa disminuyó en los animales hepatectomizados y en los tratados con putrescina a 43 y 60% de los valores controles ($p<0.05$) respectivamente. GABA previno la disminución observada en el grupo hepatectomizado. Los ensayos de Western Blot confirmaron las disminuciones obtenidas. **Conclusiones:** Los datos indican que CYP3A4, que metaboliza drogas como warfarina, acetaminofeno, cyclosporina y FK 506, disminuye considerablemente en el hígado regenerante. El aumento de putrescina durante la regeneración sería responsable de este descenso. Estos hallazgos pueden ser relevantes para el manejo farmacológico de los pacientes transplantados.

160. La sal biliar taurolitocolato (TLC) puede inhibir la descarga biliar de lisosomas en la rata.
MC Larocca, JM Pellegrino, RA Marinelli.

Instituto de Fisiología Experimental-CONICET. Facultad de Cs. Bioquím. y Farm. UN Rosario. Santa Fe.

Introducción: TLC es una sal biliar colestásica que aumenta el contenido de colesterol de la membrana canalicular. Previamente describimos que la excreción biliar de lípidos y proteínas, compuestos que alcanzan el canalículo por vía vesicular, es afectada por TLC. En este trabajo se estudió si TLC afecta también la exocitosis canalicular de lisosomas, evaluando además la integridad funcional de los mismos. **Métodos:** Se realizó una inyección i.v. de una dosis colestásica de TLC (3 μ mol/100g peso). La descarga lisosomal se evaluó midiendo la excreción biliar de las enzimas lisosomales fosfatasa ácida (FA) y β -glucuronidasa (β Glu), así como de metabolitos lisosomales de 14 C Sacarosa-Peróxidasa de rabanito (14 C Sac-HRP). La función lisosomal se estimó determinando en homogenado hepático (H) y en fracciones enriquecidas en lisosomas (ML y L) la fracción de 14 C Sac-HRP degradada (% de radiactividad TCA-soluble) 30 min luego de su inyección portal. **Resultados:** TLC disminuyó el flujo biliar (11.9 ± 0.8 vs. 20.5 ± 1.8

μ l/g híg./160 min, $p<0.001$) y las excreciones biliares de FA (300 ± 50 vs. 700 ± 88 mU/g híg./160 min, $p<0.001$) y β Glu (9 ± 2 vs. 41 ± 5 mU/g híg./160 min, $p<0.001$). Análogamente, la excreción biliar de metabolitos de 14 C Sac-HRP fue menor en ratas pretratadas con TLC (20 ± 3 vs. 63 ± 4 % dosis $\times 10^3/100$ min, $p<0.001$). El % de radioactividad TCA-soluble en H, ML y L no difirió significativamente entre ratas tratadas y controles. **Conclusión:** TLC inhibe la descarga biliar lisosomal sin alterar funcionalmente esta organela. Este hallazgo sugiere que la disminución de la fusión de las membranas lisosomal y canalicular es causada por factores extralisosomales, probablemente relacionados con la alteración de la membrana canalicular por TLC.

160b. Melatonina y protección de la mucosa gástrica. Mecanismo sulfhidrido endógeno dependiente. JA Cesolari, OM Laudanno, JM Esnarriaga, G Guastalli.

Cátedras de Histología y Embriología y de Patología Médica III. Facultad de Ciencias Médicas. U.N.R. Rosario. Santa Fe.

El objetivo de este trabajo fue investigar la acción protectora de la melatonina (M) sobre la mucosa gástrica ante la agresión del etanol 96% (ETOH) y su mecanismo de acción. **Método:** a grupos aleatorios de ratas Wistar ($n=7$) 200-230 g, en ayunas de 24hs, excepto agua ad libitum, se les realizaron los siguientes experimentos: A: solución fisiológica 1ml, IG, 20min; B: ETOH, 1ml, IG, 20 min; C: M, 1mg/kg, IG, 60 min, ETOH; D: M, 10 mg/kg, IG, 60 min, ETOH; E: M, 30 mg/kg, IG, ETOH; F: M, 60 mg/kg, IG, ETOH; G: M, 10 mg/kg, IP, 30 min, ETOH; H: Cl₂Hg al 1%, (depletor de sulfhidrilos) 1 ml, SC, 30 min, ETOH; I: Cl₂Hg al 1% 1 ml, SC, 30 min, M 10 mg/kg, IG, 60 min, ETOH. Las ratas fueron sacrificadas por sobre dosis de éter, se realizó apertura del estómago y tabuló el porcentaje de área lesional macroscópica gástrica (%) y se obtuvieron cortes para estudios histológicos (HE). **Resultados:** % A: 0.1 ± 0.1 ; B: 50.5 ± 5.5 ; C: 14.5 ± 5.8 ($P<0.01$); D: 9.3 ± 1.5 ($P<0.01$); E: 12.1 ± 2.6 ($P<0.01$); F: 11.6 ± 1.7 ($P<0.01$); G: 40.7 ± 6.2 (n.s.); H: 55.1 ± 6.1 (n.s.); I: 42.1 ± 5.9 (n.s.). Microscópicamente los grupos C, D y E sólo mostraron lesiones superficiales. Se concluyó que: 1) la M es protectora de la mucosa gástrica ante la agresión del ETOH, cuando es dada en forma IG y su acción no es dosis dependiente y 2) en su mecanismo de acción depende de los sulfhidrilos endógenos.

160c. Nuevo modelo experimental de úlcera gástrica aguda, inducida por ácido acético (UGA-AC) en ratas. Efecto del omeprazol (OME). OA Bedini, OM Laudanno, A Naves, P SanMiguel, J Cesolari, G Guastaldi, J Esnarriaga.

Cátedra de Gastroenterología, Instituto de Cirugía Exp., Fac. de Ciencias Médicas. Rosario.

Objetivo: Evaluar en un nuevo modelo experimental de (UGA-AC) producida en 24 hs con lig. del píloro (shay) la importancia de la secreción ác. Gástrica. Méto-

do: A ratas Wistar (n= 3) de 200 g, en ayuno 24 hs, agua ad libitum, se realizaron los siguientes experimentos: Grupo 1: Previa anest. se efectuó laparotomía y lig. del piloro, luego inyección submucosa de Ac. Glacial, 0.05 ml, en la unión del cuerpo y antro (LP-AC), se esperó 24 hs. Grupo 2: OME, 30 mg/kg, IP, 24 hs antes (1er. dosis) y 1 h antes (2da. dosis) luego (LP-AC) se esperó 24 hs. Grupo 3: OME IP, 1 h antes, luego (LP-AC), 24 hs. Luego de las experiencias, previa anest. las ratas fueron sacrificadas, se realizó la laparotomía, se removió el estómago, se procedió a su apertura por curvatura mayor, se obtuvo el índice de la UGA (IxU). Se realizaron cortes para estudios anatomopatológicos. Resultados: Grupo 1: IxU: 4 mm $\pm$ 0.5 mm. Grupo 2: IxU: 0. Grupo 3: IxU: 1 mm $\pm$ 0.5 mm. Conclusión: 1) La inhibición ácida dada por OME, 24 hs antes (1er. dosis) y 1 h antes (2da. dosis) en ratas con Shay bloqueó la producción de la UGA-AC. 2) Este nuevo modelo de UGA-AC con Shay, podría ser utilizado en otros estudios gástricos.

CARDIOVASCULAR II

161. Receptores B_1 y B_2 a quininas en vena umbilical humana. SP Sardi, AE Errasti, V Rey Ares, RP Rothlin.

3° Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

El objetivo de este trabajo fue evaluar si en la vena umbilical humana (VUH) coexisten receptores B_1 y B_2 a quininas. Para ello, se emplearon cordones umbilicales obtenidos de partos y cesáreas a término de madres sanas. De los mismos se obtuvieron anillos de vena que se incubaron en solución de Krebs a 37°C, burbujeados con carbógeno, a los que se aplicó una tensión basal de 2-4g. Luego del período de estabilización, se realizaron curvas concentración-respuesta (CCR) a bradiquinina (BK) y des-Arg⁹-BK (agonista B_1 selectivo) en presencia de diferentes concentraciones de antagonistas B_1 y B_2 selectivos (des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK y HOE-140, respectivamente). Des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK en concentraciones de 1, 3, 10 y 30 μ M desvió la CCR a la des-Arg⁹-BK en forma competitiva (con un pA_2 de 6,13; n=19). Además, este antagonista B_1 (10 μ M) no modificó la CCR a BK (n=5). Por otro lado, HOE-140 0,01, 0,03 y 0,1 μ M desplazó competitivamente la CCR a BK (pA_2 , 8,40; n=17); mientras que este bloqueante B_2 (0,1 μ M) no modificó la CCR a des-Arg⁹-BK (n=4). Estos resultados permiten afirmar que en el músculo liso de la VUH coexisten receptores de tipo B_1 y B_2 a quininas.

162. El preconditionamiento isquémico atenúa la disfunción post-isquémica sistólica y diastólica y el dano de la permeabilidad de la membrana del miocito en el corazón aislado de conejo. A Hita, MC Morales, RJ Gelpi, AE Bagnarelli, JM Rodríguez, O Scapin.

Lab. de Fisiopatol. Cardiovasc., Dto. de Patología, Fac. de Medicina, UBA y Grupo de Estudios Multicéntricos Argentinos (GEMA), Buenos Aires.

El preconditionamiento isquémico (PC) del músculo cardíaco en relación al tamaño de la necrosis es el proceso de protección fisiológica conocido más importante. Pero el comportamiento metabólico y de la función ventricular sistólica y diastólica en el PC son aún aspectos controvertidos. El objetivo de nuestro trabajo fue evaluar estos dos aspectos en un modelo de corazón aislado isovolumétrico de conejo. En el grupo 1 (G1, n= 13, control) se realizaron 15' de isquemia (I) seguidos por 30' de perfusión (R) y en el grupo 2 (G2, n= 10, PC) se repitió el protocolo de G1 precedido por 5' de I y 5' de R. Se midió la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI, %) y la presión de fin de diástole del VI (PFDVI, %). En el efluente se determinó láctico-deshidrogenasa (LDH, UI/l) y lactato (L, mg/dl). Los resultados fueron:

		Control	1'	2'	5'	10'	30'
PDVI	G1	100	65 $\pm$ 7	57 $\pm$ 3	48 $\pm$ 4	50 $\pm$ 5	62 $\pm$ 4
	G2	100	60 $\pm$ 3	51 $\pm$ 1	53 $\pm$ 3	63 $\pm$ 3*	75 $\pm$ 4*
PFDVI	G1	100	102 $\pm$ 17	166 $\pm$ 17	255 $\pm$ 37	296 $\pm$ 33	399 $\pm$ 36
	G2	100	135 $\pm$ 24	162 $\pm$ 30	137 $\pm$ 27*	164 $\pm$ 26*	194 $\pm$ 34*
LDH	G1	51 $\pm$ 21	341 $\pm$ 134	233 $\pm$ 49	125 $\pm$ 42	98 $\pm$ 49	79 $\pm$ 12
	G2	52 $\pm$ 19	212 $\pm$ 82	95 $\pm$ 29*	45 $\pm$ 12*	38 $\pm$ 13*	25 $\pm$ 13*
L	G1	3.9 $\pm$ 0.6	10.8 $\pm$ 0.9	5.2 $\pm$ 1.1	4.4 $\pm$ 0.8	3.1 $\pm$ 0.9	3.7 $\pm$ 0.9
	G2	4.6 $\pm$ 1.2	10.4 $\pm$ 1.8	5.8 $\pm$ 0.8	4.4 $\pm$ 1.1	4.1 $\pm$ 0.8	4.0 $\pm$ 0.6

Conclusiones: El PC atenuó la disfunción sistólica y diastólica del miocardio atontado. Los datos sugieren que también se atenuó el daño en la permeabilidad de la membrana del miocito. No obstante, no se observaron diferencias significativas en el componente metabólico (lactato) del miocardio entre ambos grupos. *: P < 0,05

163. El Tratamiento Cronico con Amiodarona Disminuye la Dispersion Transmural de la Repolarizacion Inducida por el Bloqueo de IKr en el Corazon Canino. S Moro, S Sicouri, L Nicola Siri, MV Elizari.

Lab de Electrofisiologia Celular. Cardiologia. Htal Ramos Mejia. Buenos Aires.

Introduccion: Amiodarona (AM) es un potente antiarritmico con muy pocos efectos proarritmicos comparado con otras drogas antiarritmicas cuya accion es prolongar la repolarizacion (efecto de Clase III). Hemos mostrado recientemente que el tratamiento cronico con AM retarda la repolarizacion ventricular y reduce su dispersion en el corazon canino, con un considerable incremento en la duracion del potencial de accion (DPA) en el epicardio (Epi) y el endocardio (Endo), pero un aumento menor, o aun un decremento en las celulas M (M). **Metodos:** Se aplico la tecnica de registro con microelectrodos intracelulares, en preparados sinciales de Epi, Endo y M aislados de la pared libre del ventriculo izquierdo canino, mediante el uso de un dermatomo. Los preparados fueron estimulados a ciclos de base de 500 a 8000 ms. Se examino el efecto del bloqueo de IKr por d-sotalol 100 mM en preparados tratados con AM (30-40 mg $\times$ dia /Kg durante 30-45 dias; n=5) contra no tratados (n=5) sobre la DPA al 90% de la repolarizacion (DPA90, ms). **Resultados:** En los perros

no tratados, el d-sotalol induce un aumento de las DPA en los 3 tipos celulares, pero es mucho mas marcado en las celulas M, principalmente a bajas frecuencias de estimulación. A una longitud de ciclo de 5 seg, las DPA90 fueron: Epi: 247 ± 18 vs 212 ± 28 ; M: 517 ± 130 vs 330 ± 17 ; Endo: 256 ± 14 vs 201 ± 20 ; d-sotalol vs control. En los perros tratados con AM, el d-sotalol induce un aumento mas homogéneo de la DPA de los 3 tejidos. Las DPA90 fueron: Epi: 275 ± 10 vs 246 ± 16 ; M: 326 ± 63 vs 287 ± 41 ; Endo: 339 ± 44 vs 276 ± 44 ; d-sotalol vs control. En presencia de AM, no se observaron postdespolarizaciones y actividad gatillada en las celulas M causadas por d-sotalol, aun a bajas frecuencias de estimulación. **Conclusiones:** Nuestros resultados indican que el pretratamiento con AM limita la dispersion de la repolarización intramural inducida por el bloqueo de IKr por el d-sotalol, resultando en una prolongacion mas homogénea de la repolarización en la pared ventricular.

ENDOCRINOLOGIA IV

164. **Expresión de aromatasa (P450aro) en cultivo de células testiculares humanas (cTh) prepúberes (PP) y durante el desarrollo puberal (Pu). Posible rol regulatorio en la síntesis de testosterona (T).** N Saraco, E Berensztein, A Dardis, MA Rivarola, A Belgorosky.

Lab. Investigación. Hospital Garrahan. Buenos Aires.

Existe escasa información sobre la expresión de la P450aro en el Th PP. Hemos descripto que la secreción de T basal por cTh PP aumenta durante los días de cultivo. El objetivo de este estudio fue evaluar la expresión de la P450aro en relación a la síntesis de T. Se estudió: 1) la expresión del RNAm de P450aro en células testiculares humanas PP(Gr1, n=15) y en Pu Tanner 5 (Gr2, n=2) al día 6 de cultivo utilizando la técnica de RT-PCR, 2) los niveles de P4, 17OHP4 y T en incubaciones por triplicado en función de la expresión del RNAm de P450aro en el medio condicionado del día 2, 4 y 6 de cultivo. En el Gr1 el RNAm P450aro fue negativo (-) en 12 y positivo(+) en 3 y en el Gr2 fue(+) en 2/2. En el Gr1 P450aro(-) los niveles de P4 descendieron y los de 17OHP4 y T aumentaron pero sólo T fue significativo durante los días de cultivo ($X \pm ES$, Día 2: $2,32 \pm 0,67$, Día 4: $10,8 \pm 2,29$, Día 6: $42,8 \pm 9,90$ pmol/10⁶ cel. 24hs, $p=0,01$). En Gr1 P450aro(+) P4 y 17OHP4 fueron siempre similares y la T Día 2: $66,3 \pm 61,6$, Día 4: $2,89 \pm 2,37$, Día 6: no detectable. En el Gr2 no se observaron cambios de la T durante los días de cultivo. El hecho que la T basal aumenta durante los días de cultivo en los PP P450aro(-) y disminuye en PP P450aro(+) y no cambia en los Pu P450aro(+) sugiere un rol de los estrógenos en la regulación de la síntesis de T basal en el Th PP produciendo una lesión a nivel de la P450c17, similar a la descripta luego del estímulo con HCG en Leydig madura.

165. **Papel del Factor de Crecimiento Fibroblástico básico (bFGF) y del Factor de Crecimiento**

Neural 8 (8NGF) sobre los parámetros funcionales de las células de Sertoli. H Schteingart, S Meroni, D Cánepa, E Pellizzari, S Cigorraga.

CEDIE. Hospital de Niños «R Gutiérrez». Buenos Aires.

Las células germinales regulan la función de las células de Sertoli «in vivo» e «in vitro». Recientemente se ha demostrado la producción de bNGF y bFGF por las células germinales y se ha postulado que estos péptidos podrían participar en la comunicación intercelular Sertoli/Germinal. El objetivo del presente trabajo fue determinar si estos péptidos podían regular la función de la célula de Sertoli. En cultivos de células de Sertoli se determinaron las actividades de g-glutamyl-transpeptidasa (g-GTP) y aromatasa y la secreción de transferrina (Trf) al medio de cultivo en condiciones basales (B) o con concentraciones variables de bFGF (0.1-50 ng/ml) o de bNGF (0.1-25 ng/ml). Los resultados obtenidos se expresan como $X \pm SD$, $n=4$, $*p<0,01$. El bFGF modificó los tres parámetros estudiados. Estimuló la actividad de γ -GTP: B: $9,4 \pm 1,8$; 0,1: $9,5 \pm 0,9$; 1: $12,2 \pm 3,8$; 10: $16,5 \pm 1,1$; 50: $21,7 \pm 2,8$ (pmol p-N-anilina/ μ g DNA/min); estimuló la secreción de Trf: B: $13,7 \pm 2,3$; 0,1: $13,8 \pm 2,0$; 1: $17,5 \pm 1,5$; 10: $21,1 \pm 0,4$; 50: $30,2 \pm 3,1$ (ngTrf/ μ g DNA) e inhibió la producción de estradiol a una concentración de 10 ng/ml; B: $48,6 \pm 4,8$; bFGF: $26,1 \pm 1,0$ (pgE₂/ μ g DNA). El tratamiento con β NGF (0,1-25ng/ml) no modificó la actividad de γ -GTP ni la secreción de Trf. En los cultivos estimulados con 10 ng/ml la producción de estradiol disminuyó: B: $48,6 \pm 4,8$; β NGF: $35,1 \pm 2,1$ (pgE₂/ μ g DNA). En conjunto los resultados obtenidos sugieren que β NGF y bFGF podrían participar en grado variable en la regulación funcional de las células de Sertoli producida por las células Germinales.

166. **Estudio de la interacción macrófago célula de Leydig en ratas con orquitis autoinmune experimental.** MO Suescuna, b, RS Calandra, b, c, L Lustig. IMBICE, La Plata; bFacultad de Ciencias Exactas, UNLP;

cIBYME CONICET; d CIR, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Previamente demostramos la inducción en ratas de un cuadro de orquitis autoinmune experimental(OAE) caracterizado por aspermatogénesis y aumento en el número de macrófagos (M) y células de Leydig(CL). En las ratas con OAE observamos además un aumento en la producción *in vitro* de testosterona(T). A su vez, el medio condicionado de M (MCM) en una proporción del 30% aumenta significativamente la producción de T por CL de ratas normales (SAIC,95). El objetivo del presente trabajo fue estudiar aspectos morfológicos-funcionales de la interacción M-CL. Por microscopía electrónica, se observó en los testículos de ratas con OAE un aumento(vs controles) de las inter-digitaciones, especializaciones de membrana y vesículas de endocitosis en M y CL. Asimismo, se observó un aumento en la producción *in vitro* de T por CL normales en presencia de MCM proveniente de ratas con OAE vs MCM de ratas contro-

les Los resultados obtenidos incubando con 0.06, 0.5 ó 1mUI de hCG fueron: OAE, 5.64 ± 0.153 vs control: 4.03 ± 0.45 ; 6.97 ± 0.65 vs 6.03 ± 0.01 y 14.59 ± 0.939 vs 11.17 ± 0.002 respectivamente ($p < 0.05$). El efecto estimulador del MCM es sensible al tratamiento con ácidos (CIH 2N) y/o con calor (100° , 120min.). Estos resultados sugieren una activa interacción morfológico-funcional entre M y CL en la OAE.

- 167. «Pseudohermafroditismo masculino (PHM) en el síndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLO). Estudio in vitro»** EB Berensztein, N Saraco, MA Torrado, A Belgorosky, MA Rivarola.

Lab. Investigación, Serv. Genética, Hospital Garrahan. Buenos Aires.

El SLO es una enfermedad autosómica recesiva por deficiencia de la 7-dehidrocolesterol- $\Delta 7$ reductasa (7DHCR). Presenta retardo mental, dismorfias múltiples y PHM de causa desconocida. El objetivo fue estudiar la esteroidogénesis testicular en cultivo de un paciente de 33 meses de edad con SLO. De un fragmento de los testículos obtenidos por orquidectomía se aisló y cultivó una suspensión celular mixta durante 8 días. La testosterona (T) basal (B) fue, paradójicamente, significativamente mayor que en tres cultivos control de la misma edad ($X \pm DS$ 26.1 ± 0.45 vs 1.42 ± 0.71 pmol/ 10^6 cel.día respectivamente, $p < 0.01$). Ni LH ni hCG aumentaron la TB mientras que Insulina (5000ng/ml) y FSH (2ng/ml) aumentaron significativamente la T (118 ± 12.9 y 100 ± 37.9 respectivamente, $p < 0.05$). In vivo, la TB sérica fue alta (1.95 ng/ml normal < 0.5) y no hubo respuesta de hCG (1.98ng/ml), pre-orquidectomía. Se cultivó un testículo control en presencia de BM 15766 (inhibidor de 7DHCR) observándose una inhibición de la T bajo LH (LH: 30.6 ± 3.06 , LH+BM15766: 19.9 ± 1.35 , $p = 0.003$). La falta de respuesta al LH/hCG en la vida fetal secundaria a la alteración de la síntesis del colesterol podría afectar la diferenciación de los genitales externos.

- 168. Regulación de la estimulación por FSH de la actividad aromataza de la célula de Sertoli por agonistas purinérgicos.** D Cánepa, S Meroni, H Schteingart, E Pellizzari, S Cigorruga.

CEDIE. Hospital de Niños «R Gutiérrez». Buenos Aires.

Recientemente se ha demostrado la presencia de receptores purinérgicos A1 y P2 en células de Sertoli. El objetivo del presente trabajo fue estudiar si existía regulación de la actividad aromataza estimulada por FSH por ocupación de dichos receptores. Se utilizaron como agonistas para los A1: Adenosina (ADO, 100nM), N6-ciclohexiladenosina (CHA, 100nM) y N6-(2-fenilisopropil)-adenosina (PIA, 100nM). La producción de Estradiol (pg/ μ g ADN, $x \pm DS$, $n = 3$) en cultivos de células de Sertoli estimuladas con FSH (100ng/ml) y Testosterona (3 μ M) por 18 horas en ausencia (B) o en presencia de las drogas fue: B: 47.2 ± 0.16 ; ADO:

$34.7 \pm 2.6^*$; CHA: $29.5 \pm 3.8^{**}$; PIA: $29.8 \pm 4.4^{**}$ ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$). Cuando el ensayo de aromatización se realizó con 0,2mM de dibutiril AMP cíclico (dbAMPc) no se observó efecto inhibitorio. La ocupación de los receptores tipo P2 con ATP (100 μ M) o ADP (100 μ M) también inhibió la producción de estradiol, B: 51.9 ± 4.8 ; ATP: $29.4 \pm 2.7^{**}$; ADP: $30.1 \pm 3.5^{**}$. Esta inhibición siguió observándose cuando el ensayo de aromatización se realizó con dbAMPc. Estos resultados sugieren que el efecto producido por la ocupación de los receptores tipo A1 (acoplados a Gi) se debe a la disminución de los niveles de AMPc, mientras que la regulación producida por la ocupación de los receptores tipo P2 (acoplados al turnover de fosfolípidos) ocurre en un punto distal a la producción de AMPc.

- 169. Efecto del tratamiento prolongado con agonistas purinérgicos sobre parámetros funcionales de la célula de Sertoli en cultivo.** S Meroni, D Cánepa, H Schteingart, E Pellizzari, S Cigorruga.

CEDIE. Hospital de Niños «R Gutiérrez». Buenos Aires.

En el presente trabajo se analizó el efecto que el tratamiento prolongado con agonistas purinérgicos, ejercía sobre dos parámetros funcionales de la célula de Sertoli (actividades de J-glutamiltansaminasa: g-GTP y aromataza). Como agonistas de los receptores A1 se utilizó Adenosina (ADO, 100 μ M) y N6-ciclohexiladenosina (CHA, 100nM) y para los receptores P2, ADP y ATP (100 μ M). La actividad de γ -GTP no varió por el tratamiento con los agonistas en ninguna de las condiciones estudiadas. Los resultados obtenidos para la actividad aromataza fueron: Basal: 56.6 ± 7.1 ; ADO: $83.4 \pm 8.7^*$; CHA: $81.9 \pm 2.7^*$; ATP: $71.3 \pm 6.5^*$; ADP: $72.4 \pm 5.3^*$ (pg estradiol/ μ g DNA, $x \pm DS$, $n = 3$, $*p < 0.01$). El tratamiento por tres días con 100ng/ml de FSH o con 0,2mM de dibutiril AMPcíclico (dbAMPc) resulta en una diferenciación de la célula de Sertoli que se manifiesta en una disminución de la actividad aromataza. Se estudió si existía efecto de los agonistas purinérgicos sobre la disminución de la actividad aromataza producida por FSH. Tanto ADO como ATP revirtieron el efecto de FSH: Basal: 56.6 ± 7.1 ; FSH: $35.7 \pm 2.7^*$; FSH+ADO: 54.0 ± 3.9 ; FSH+ATP: 54.6 ± 3.2 . El efecto inhibitorio del dbAMPc fue revertido por ATP y no por CHA: Basal: 53.2 ± 3.9 ; dbAMPc: $34.6 \pm 7.1^*$; dbAMPc+CHA: $30.9 \pm 1.3^*$; dbAMPc+ATP: 59.1 ± 2.6 . Estos resultados sugieren que la ocupación de los receptores A1 (acoplados a Gi) y la ocupación de los receptores P2 (acoplados a una G que estimula el turnover de fosfolípidos), modifican el estado de diferenciación de la célula de Sertoli tanto en condiciones basales como bajo estímulo hormonal. En particular en este último caso la acción se produciría por la regulación de los niveles de AMPc para los agonistas A1 y en puntos distales a la producción del nucleótido para agonistas P2.

- 170. Regulación hormonal de la producción de inhibinas diméricas en células de la granulosa.**

G.Lanuza¹, P.Saraçüeta¹, S.Ayuso², N.Groome³, J.L.Barañao¹ y S.Campo².

¹IByME, Dto.Qca.Bol6gica, FCEyN, Universidad de Buenos Aires; ²CEDIE, Htal.R.Gutierrez y ³Oxford Brookes University.

La inhibina es un péptido dimérico de origen gonadal que regula la secreción hipofisaria de FSH y participa como modulador de la función ovárica y testicular. Está constituida por una subunidad a y una b; de esta última existen dos formas bA y bB, lo que da origen a la formación de inhibinas A (InhA) y B (InhB). Recientemente se han desarrollado inmunoensayos que permiten diferenciar los dímeros biológicamente activos. Dado que se han reportado variaciones en los niveles plasmáticos de ambas formas durante el ciclo menstrual, el objetivo del presente trabajo fue estudiar la regulación diferencial de la producción de InhA y B por hormonas y factores de crecimiento en cultivos de células de granulosa de rata. La producción basal de InhA fue marcadamente superior a la de InhB (relación A/B: 15/1). El tratamiento con estradiol (E₂), FSH e IGF-I aumentó la producción de InhA (3, 9.5 y 2 veces del control respectivamente). Los niveles de InhB fueron estimulados por FSH e IGF-I (4 y 3.3 veces control) mientras que E₂ no tuvo efecto. El TGF- β incrementó la producción de ambas inhibinas (3.6 y 3.3 veces). Sin embargo, la combinación de TGF- β y FSH incrementó sinérgicamente la producción de InhA y fue el estímulo más potente para InhB. Este tratamiento fue la única condición experimental que disminuyó significativamente la proporción InhA/InhB (relación A/B: 2/1). Estos resultados muestran que las hormonas y los factores intraováricos ejercen un efecto diferencial sobre la producción de InhA e InhB que podría estar relacionado con efectos específicos de regulación de la función gonadal.

171. «Comparación de la expresión de las enzimas 17beta-hidroxiesteroide dehidrogenasa y citocromo P450 aromatasas en células granulosas». SA Ghersevich*, M Poutanen#, R Vihko#.

*Area Biología, Fac. de Cs. Bioq. y Farmac., UNR (Rosario). #Dep. de Química Clínica, Univ. de Oulu (Finlandia).

La 17beta-hidroxiesteroide dehidrogenasa tipo 1 (17HSD) y la citocromo P450 aromatasas (P450aro) son enzimas (Ez) esenciales para la síntesis del estradiol en células granulosas (CG) ováricas. Este trabajo analiza la expresión (Ex) y la actividad (A) de las enzimas 17HSD y P450aro en CG humanas y de rata en cultivo bajo distintos tratamientos hormonales. La Ex de los ARNm de las enzimas se estudió mediante Northern blot y las A enzimáticas por la conversión de sustratos tritiados adecuados. En CG lúteas humanas se observó una alta correlación entre las A de ambas Ez ($r=0.932$, $p<0.001$). El tratamiento de las CG humanas con LH o FSH incrementó la A de P450aro ($p<0.05$) pero no así la de 17HSD. En CG de rata la A y la Ex de ambas Ez aumentaron en forma dosis-dependiente de la FSH. El trata-

miento de las CG con Br-cAMP incrementó las Ex de ambas Ez. La Ex de ambas Ez fue mayor en CG tratadas con (FSH + testosterona) comparado con las tratadas con FSH sola. En cambio, con (FSH + factor de crecimiento epidermal) disminuye marcadamente la Ex de ambas Ez. P450aro y 17HSD serían reguladas en forma coordinada, excepto cuando quizás influya el estado de maduración de las CG. Ambas Ez son reguladas por mecanismos dependientes de cAMP.

172. Regulación hormonal de la síntesis de esteroides. LA Dada, PG Mele, CF Mendez, EJ Podestá. Lab. HRDC.

Dto. de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina Universidad de Buenos Aires.

Se ha propuesto que varios de los pasos desencadenados luego de la unión de ACTH a su receptor son regulados por calcio, entre ellos la transferencia de colesterol de la membrana mitocondrial externa a la interna. El objetivo del presente trabajo es estudiar el efecto del Ca²⁺ sobre la estimulación de la síntesis de esteroides en mitocondrias aisladas de zona fasciculata adrenal, utilizando un ensayo de recombinación de fracciones subcelulares. Para ello, se aislaron mitocondrias en condiciones de depleción de Ca²⁺. El contenido de Ca²⁺ libre mitocondrial se determinó utilizando el indicador fluorescente Fura 2. La entrada del indicador se corroboró por la aparición de una señal sensible al Ca²⁺ e inhibible por Mn²⁺, no afectada por digitonina. La depleción y reposición de Ca²⁺ mitocondrial es un evento rápido, que permite variar los valores en el tiempo necesario de estímulo de la síntesis de esteroides. Mitocondrias de adrenales depletadas de Ca²⁺ pueden ser estimuladas por factores ACTH-dependientes (1,8 $\pm$ 0,3 vs 6,1 $\pm$ 0,6 ng progesterona/adrenal, control vs ACTH). Por el contrario la reposición de Ca²⁺ en ausencia de los factores esteroideogénicos no fue suficiente, observándose sólo una tendencia al aumento el cual no fue significativo (2,4 $\pm$ 0,5; 2,3 $\pm$ 0,6; 3,2 $\pm$ 0,8; 3,4 $\pm$ 0,6 para concentraciones de Ca²⁺ libre de 0; 100; 350; 500 nM). Cuando las mitocondrias se estimulan sin reposición de Ca²⁺ durante el ensayo igual se puede observar una estimulación de la síntesis de esteroides. Estos resultados sugieren que el calcio per se no es capaz de estimular el paso limitante de la esteroideogénesis, siendo necesaria la presencia de los factores que dependen de la hormona.

173. Expresión del RNAm de 3 β hidroxisteroide de hidrogenasa (3 β HSD) en tejido adrenal humano prepúber (TAhPP) en función de la edad cronológica. A Dardis, N Saraco, MA Rivarola, A Belgorosky.

Lab. Investigación, Hospital Garrahan. Buenos Aires.

La adrenarquia sólo ocurre en los primates superiores y en el humano comienza entre los 6-8 años de edad (E). El mecanismo por el cual ocurre este fenómeno no está dilucidado. El objetivo de este estudio fue evaluar la expresión 3 β HSD en TAhPP en función de la E asumiendo

do como hipótesis que podrían haber cambios madurativos en la adrenal que condicionen una menor actividad 3β HSD. Se realizó la extracción de RNA total de TAñ normal de 9 pacientes entre 0,1 y 13 años de E. El RNAm de 3β HSD fue evaluado en todas las muestras por Dot Blot con una sonda de cDNA humana. La especificidad de la sonda fue confirmada por Northern Blot en 2 muestras y en un control de placenta humana obteniéndose una banda de 1,7 kb característica de RNAm de 3β HSD y b Actina. Los resultados fueron evaluados en función de la E los <8 años a $n=6$ y los >8 años a $n=3$ comparando en cada muestra la intensidad de Blotting entre el RNAm de 3β HSD y β Actina. Se observó que el RNAm de 3β HSD fue menor a partir de los 8 años de E ($X \pm DS$: $0,33 \pm 0,22$ vs $5,5 \pm 3,43$ Unidades arbitrarias, $p=0,04$). Se concluye que la menor expresión del RNAm de 3β HSD podría favorecer el incremento de los esteroides D5 y ser uno de los mecanismos involucrados en la adrenarca. La regulación de este cambio madurativo deberá ser dilucidado.

174. Actividad 11β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (11β -HSD) en adrenal de rata. DG Romero, EN Cozza.

Dpto. Química Biológica, FCEyN-UBA y PRHOM (CONICET), Buenos Aires.

La existencia de actividad de 11β -HSD adrenal posibilitaría otro mecanismo de regulación de la esteroidogénesis. En fracciones subcelulares [Núcleo (N), Mitochondrias (M), Microsomas (m) y Soluble (S)] de adrenal de rata se midió la conversión de corticosterona (B) tritiada (B^*) a 11 -dehidrocorticosterona (A) en presencia de NAD^+ o $NADP^+$, y de A^* a B^* en presencia de $NADH$ o $NADPH$. La conversión de B en A con m ($n=10$) fue 104200 ± 5210 (NAD^+) y 35313 ± 1420 ($NADP^+$) dpm/mg proteína.min. La conversión de A^* en B^* fue de 10806 ± 595 (NAD^+) y 8266 ± 345 ($NADP^+$) dpm/mg proteína.min. Los cofactores fueron aditivos: 3960 ± 220 (NAD^+), 7640 ± 535 ($NADP^+$) y 13786 ± 830 ($NAD^+ + NADP^+$) dpm/mg proteína.min ($n=4$). Los EC_{50} para la inhibición de 11β -HSD por 11α -hidroxiprogesterona y ácido glicirretínico fueron 0.0012 ± 0.0001 y 94.3 ± 8.2 nM (NAD^+), y 0.31 ± 0.04 y 2.02 ± 0.18 μ M ($NADP^+$), respectivamente. Fraccionamiento subcelular (% de actividad con NAD^+ y $NADP^+$): N= 35.8 y 15.9, M= 21.7 y 15.0, m= 42.5 y 60.9 y S= 0 y 8.2 %. Los resultados indican que la adrenal de rata tiene actividad de 11β -HSD dependiente de NAD^+ (11β -HSD-I) y dependiente de $NADP^+$ que no correspondería a 11β -HSD-II.

TUMORES IV

175. Pérdida de heterocigocidad para el gen RB1 en adenomas paratiroides. A Arbetman, I Sziján, A Castellanos, P Vergani, HP Curutchet, NA Mezzadri, B Elsner, OD Bruno.

División Endocrinología, Cátedra de Genética y Biología Molecular, Depto de Patología y División Cirugía Oncológica, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires.

Estudios previos de las alteraciones oncogénicas en tumores paratiroides han demostrado sobre-expresión del oncogen ciclina D (PRAD) en los adenomas mientras que en carcinomas se ha descrito mutación del gen del retinoblastoma (RB1). En este trabajo se investigó el gen RB1 en 6 mujeres con hiperparatiroidismo primario (5 adenomas, 1 carcinoma) y en un varón con hiperparatiroidismo secundario. El estudio fue realizado sobre cortes de tumor embebido en parafina y en leucocitos de sangre periférica. Se determinó la presencia de alteraciones en el gen RB1 por medio de análisis de marcadores polimórficos: Rb 120 y Bam HI. Se utilizó la técnica de amplificación por PCR, digestión enzimática y análisis de RFLPs por electroforesis. En 2 de 6 adenomas se detectó pérdida de heterocigocidad (LOH) en el DNA tumoral comparado con el DNA leucocitario. Esto indica ausencia del alelo normal y, por tanto, inactivación del gen RB1. Los presentes resultados sugieren que esta inactivación del RB1 podría constituir un factor en el desarrollo tumoral y ocurrir no sólo en carcinoma sino en adenomas paratiroides. (parcialmente realizado bajo el contrato CI1*-CT93-0025 ; DG 12 HSMU, EEC).

176. Aplicación de dos polimorfismos intragénicos en la predicción del desarrollo de retinoblastoma (RB). D Borelina, A Arbetman, DL Parma, J Manzitti, C Barreiro, J Herrera, A Fandiño, M Abdala, MT Dávila, I Sziján.

Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica; Hospital José de San Martín, UBA. Hospital de Pediatría Juan P Garrahan. Buenos Aires.

El Rb es un tumor ocular maligno que se desarrolla en recién nacidos y niños hasta los 3 años. Tiene una incidencia de 1:20000 individuos, pudiendo ocurrir en forma a esporádica o hereditaria. La conversión de las células precursoras de la retina a malignas es el resultado de mutaciones que ocurren en el gen RB1. Los análisis de ADN hacen posible predecir la incidencia de Rb en familiares. Se amplificaron por PCR las regiones del gen conteniendo los polimorfismos Bam HI y RB1.20, analizando los fragmentos resultantes de la digestión enzimática en geles de agarosa y poliacrilamida. Fueron estudiadas 14 familias con pacientes con Rb uni y bilaterales, resultando informativas 7 de las mismas. Se halló pérdida de heterocigocidad en el ADN tumoral (por ausencia de uno de los dos alelos), en 2 familias analizadas por RB1.20. Las 3 familias con Rb bilateral (hereditario) fueron informativas, partiendo de muestras de sangre sin necesidad de procesar tumores, ya que se contó con 2 generaciones de pacientes afectados. Con estos resultados podemos identificar el alelo mutado, el origen parental del mismo y estudiar su segregación en los descendientes de los pacientes.

- 177. Obtención de una biblioteca combinatorial para el desarrollo de anticuerpos recombinantes contra c-erbB-2.** AG Mladovan, P Mateos, V Grüntzig, T Watanabe, A Baldi.

Instituto de Biología y Medicina Experimental. Obligado 2490, 1428 Buenos Aires. CNEA.

La sobre-expresión de la proteína c-erbB-2 (p185^{c-erbB-2}) es característica de diversas neoplasias que incluyen al cáncer de mama, estómago y colon. En nuestro laboratorio hemos desarrollado distintas estrategias para obtener anticuerpos (Ac) recombinantes expresados como proteínas de fusión en el fagémido pComb3 (The Scripps Research Inst) en combinación con el fago colaborador M13KO7. Utilizamos como inmunógeno a una fracción del dominio extracelular clonado y expresado en bacterias (p48^{c-erbB-2}) administrado a ratones Balb/C. Se obtuvo respuesta inmunológica de acuerdo con el reconocimiento de la proteína intacta p185^{c-erbB-2} o con p48^{c-erbB-2}, mediante Western blot. El ARNm fue purificado a partir de esplénocitos y utilizando "primers" específicos amplificamos genes porciones de las cadenas pesadas (Fv) y livianas (L) de IgG1. Dichos cADN fueron insertados en reacciones independientes en el fagémido pComb3 previamente digerido con XhoI-SpeI, sitio de ligado para Fv y SstI-SpeI para L que se electroporaron en E. coli JS5. De ello resultó la obtención de una biblioteca combinatorial del orden de 10⁶ recombinantes conteniendo porciones de genes de inmunoglobulinas. Esta tecnología nos permitió seleccionar Ac monoclonales específicos contra el antígeno de interés.

- 178. Ensayo clínico de fase I de inmunoterapia activa específica comparando vacunas de células autólogo-gas, lisados alogeneicos y células heterólogas en pacientes de melanoma estadios III y IV.** J Mordoh, C Kairiyama, L Bover, Al Bravo, E Solarolo y C Carbone.

IIB-BA «Fundación Campomar», Inst Alexander Fleming-CIO, Hosp Eva Perón, Inst. Nac. de Microbiología Carlos Malbrán, Fac. Cs. Veterinarias, UNLP. Buenos Aires.

Se efectuó un Ensayo Clínico de Fase I de inmunoterapia activa específica (IAE) sobre 44 pacientes con melanoma Estadio III (AJCC) (29 pacientes) ó Estadio IV (15 pacientes). El propósito del estudio fue medir la toxicidad y la respuesta inmune de tres tipos diferentes de vacunas: células tumorales autólogas irradiadas (5000cGy), lisados mecánicos de la línea celular de melanoma IIB-MEL-J, y una mezcla de tres líneas celulares heterólogas irradiadas (5000cGy): IIB-MEL-J, IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN. La eficacia de la irradiación para abolir totalmente la capacidad replicativa de las células fue determinada previamente in vitro e in vivo (ratones nude). Los pacientes fueron pretratados con ciclofosfamida 300mg/m² para potenciar la respuesta inmune. Las vacunas fueron inyectadas junto con BCG como adyuvante inmunológico. Se efectuaron 296 vacunaciones y las vacunas fueron totalmente seguras ya

que en ningún caso se observó desarrollo local de tumores. Solamente las vacunas con células enteras indujeron inmunidad de tipo hipersensibilidad retardada. La toxicidad más frecuente fue eritema y edema local, aunque la inyección de lisados produjo ocasionalmente dolor e hipotensión. Mientras el número de células heterólogas / vacuna fué constante (15x10⁶), el número de células autólogas / vacuna fue sumamente variable (12 ± 13,3 x 10⁶) debido al diferente tamaño y celularidad tumoral. No se observó remisión de enfermedad en pacientes con Estadio IV. Se concluye: 1) La IAE es segura y poco tóxica; 2) las vacunas con células heterólogas y autólogas son más eficaces que los lisados para inducir inmunidad; 3) Las vacunas con células heterólogas ofrecen mayor reproducibilidad que las de células autólogas.

- 179. Estudio de lípidos y lipoproteínas en pacientes que desarrollaron tumores malignos.** J Ibarra, R Abaurre, E Maneschi.

Cátedra de Clínica Médica II, Hospital Italiano, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo.

Existen datos contradictorios respecto a si la hipocolesterolemia facilita el desarrollo de tumores malignos o si es consecuencia del mayor consumo por las células neoplásicas. Por otra parte, hallazgos recientes parecen demostrar que existiría una correlación entre el mayor consumo de grasas y una mayor incidencia de ciertos tumores. El objetivo de este trabajo fue comparar la concentración de lípidos, lipoproteínas y ácido úrico, antes y al tiempo del diagnóstico de la enfermedad. Se estudiaron 18 pacientes con tumores malignos, 3 mujeres; edades entre 49 y 65 años. Los tumores fueron: colon 5, mama 4, pulmón 4, estómago 2, parótida 1, sarcoma 1, cerebro 1. Se encontró una disminución significativa del colesterol total (254 ± 32 vs 182 ± 44 mg/dl, p < 0,005) y LDL-colesterol (167 ± 24 vs 106 ± 34 mg/dl, p < 0,005); mientras que no hubo una diferencia significativa en los triglicéridos (201 ± 52 vs 192 ± 56 mg/dl), HDL-colesterol (46 ± 6 vs 45 ± 4 mg/dl) y ácido úrico (5,5 ± 2,0 vs 6,1 ± 1,5 mg/dl). No hubieron cambios significativos en el peso corporal. Se destaca el antecedente de hiperlipemia en pacientes con tumores malignos y el descenso del colesterol total y LDL-colesterol en el momento del diagnóstico.

- 180. Estudio de los factores de riesgo cardiovascular en pacientes con tumores malignos.** R Abaurre, J Ibarra, R Pérez, E Maneschi.

Cátedra de Clínica Médica II, Hospital Italiano, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo.

Estudios recientes parecen demostrar que el mayor consumo de grasas se acompaña de una elevada incidencia de algunos tumores malignos. Por otra parte, la hiperlipemia (HLP) provoca una alteración del funcionamiento del sistema monocito-macrófago y de los mecanismos de inmuno-vigilancia y una mayor actividad

oxidativa. El objetivo de este trabajo fue aportar datos para establecer si existe alguna relación entre factores de riesgo y tumorigénesis. Se estudiaron 85 pacientes con distintos tipos de tumores malignos; 36 hombres; sus edades oscilaron entre 18 y 85 años. Se los comparó con un grupo control de 64 sujetos, apareado por sexo, edad y peso. Se encontró una mayor frecuencia de diabetes mellitus ($p < 0,05$), hiperlipemia ($p < 0,01$), hipertensión arterial ($p < 0,005$), tabaquismo ($p < 0,0005$), enfermedad coronaria ($p < 0,01$) y litiasis vesicular ($p < 0,05$). Se destaca la mayor prevalencia de factores de riesgo cardiovascular en pacientes con tumores malignos.

181. Carcinoma de mama de varón: marcadores de comportamiento biológico que contribuyen a un pronóstico adverso. MM Muñoz de Toro, EH Luque.

Lab. Endocrinología y Tumores Hormonodependientes. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. UNL, Santa Fé.

En el varón el carcinoma (ca) de mama es una patología poco frecuente que en general se asocia a un pronóstico poco favorable, atribuido a un diagnóstico tardío y características anatómicas. En el presente estudio se evalúan parámetros histopatológicos convencionales y nuevos marcadores moleculares tratando de elucidar las causas de este pronóstico adverso. Cortes consecutivos de 18 ca de mama de varón tomados de archivo se colorearon con H-E y se inmunomarcaron para evaluar la expresión de receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), proteína del stress/golpe de calor hsp27, PCNA y Ki-67. Datos relativos a los pacientes, tamaño y extensión tumoral (T), compromiso ganglionar (N) y metástasis a distancia (M) se tomaron de las historias clínicas. Todos los ca estudiados fueron invasivos, predominando el tipo ductal infiltrante. La mayoría de los tumores fueron de bajo grado histológico (según SBR I: 39%, II: 44%, III: 17%). Observamos una alta incidencia de T4 (56%) que se correlacionó con el compromiso ganglionar ($r_s: 0,602$). El 61% de los tumores fue RE+, el 72% RP+ y todos hsp27+. Los marcadores de proliferación celular: índice mitótico, PCNA y Ki-67 se correlacionaron positivamente con la expresión de RE y RP. Los tumores con fenotipo RE-/RP- exhibieron los menores índices de proliferación. Nuestros resultados sugieren que el pronóstico adverso del cáncer de mama de varón dependería, no sólo de un diagnóstico tardío y/o una diseminación facilitada por aspectos anatómicos, sino también por la alta expresión de hsp27 y su posible relación con el comportamiento metastásico y/o de la alta expresión de RE y RP que en lugar de asociarse con buen pronóstico se correlacionan con una mayor actividad proliferativa del tumor.

182. Vacunas de células heterólogas prolongan la sobrevida libre de enfermedad en pacientes con melanoma estadio III (AJCC): ensayo clínico de fase II no randomizado. J Mordoh^{1,2}, C Kaiyama¹, L Bover¹, Al Bravo³ y E Solarolo⁴.

1IBB- BA «Fundación Campomar», 2Inst. Alexander Fleming-CIO, 3Htal. Eva Perón, 4Inst. Nac. Microbiología Carlos Malbrán. Buenos Aires.

La incidencia del melanoma está en rápido aumento y en gran número de casos la extirpación del tumor primario se efectúa cuando ya ha metastatizado. El primer sitio de metástasis es en 80% de los casos los ganglios linfáticos regionales (Estadio III). Cuando éstos son extirpados, el paciente queda libre de enfermedad clínica, pero la chance de recurrencia oscila entre el 40-80%. Sobre 28 pacientes en este estadio se efectuó un ensayo clínico de adyuvancia con vacunas heterólogas de melanoma, cada una compuesta por 15×10^6 células de melanoma irradiadas (5000cGy) (partes iguales de las líneas celulares IIB-MEL-J, IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN), utilizando BCG como estimulante inespecífico. Antes de cada vacuna (72 hr) el paciente recibió ciclofosfamida (300mg/m²). El grupo control estuvo compuesto por 24 pacientes tratados solamente con observación. Las vacunaciones comenzaron dentro de los 60 días post-cirugía: 1º año: 4 cursos cada 21 días y 1 curso cada 2 meses; 2º año: 1 curso cada 2 meses; 3º, 4º y 5º año: 1 curso cada 6 meses. Composición del grupo tratado: 18 hombres (64,3%) y 10 mujeres (35,7%), edad promedio $48,3 \pm 14,2$ años (rango 16-70 años). Composición del grupo control: 18 hombres (75%) y 6 mujeres (25%), edad promedio $49,8 \pm 14,2$ años (rango 26-73 años). La primera evaluación se efectuó a los 5 años post-cirugía, siendo el menor tiempo de seguimiento de 11 meses y existiendo actualmente 14 observaciones. La mediana de la sobrevida de enfermedad no censadas fue de 7 meses (grupo control) y 23 meses (grupo tratado), diferencia altamente significativa ($p < 0,001$). En las condiciones de este ensayo clínico, el tratamiento con vacunas heterólogas aumenta la sobrevida libre de enfermedad en de pacientes con melanoma estadio III.

183. Estudio de la actividad citotóxica/citostática de compuestos purificados de organismos marinos. L Puricelli, L Hernandez Franco, J Palermo, A Seldes y E Bal de Kier Joffé.

Instituto de Oncología «A.H. Roffo»; UMYMFOR (FCEN), Universidad de Buenos Aires.

PV-625, un alcaloide peptídico obtenido de una esponja (PM:773) y HO-7-H-5, un alcaloide indólico aislado de un tunicado (PM:578) fueron ensayados in vitro sobre células murinas (LMM3) y humanas (Hep-2) para determinar su capacidad citotóxica/citostática. Células, en fase logarítmica y estacionaria de crecimiento, fueron tratadas con distintas dosis (5nM-30µM) de los compuestos. A las 24-48 hs se evaluó el número de células vivas por recuento o por actividad metabólica (MTS). No se encontraron diferencias entre las células de origen humano o murino tratadas en subconfluencia durante 24 hs con ambos alcaloides, siendo la DC50 de 2µM para HO-7-H-5 y 20 veces mayor para PV-625. Las células en proliferación fueron más sensibles al efecto citotóxico de estas moléculas. A las 48 hs de tratamiento con HO-7-H-5, la DC50 para Hep-2 fue 17nM, mientras

que para LMM3 resultó ser de 1,04 μ M. Para PV-625, la DC50 está en el rango de 5 μ M para ambos tipos celulares. Los efectos observados son reversibles, dependiendo de la dosis y el tiempo de tratamiento. Con naranja de acridina se observaron cambios nucleares compatibles con muerte por apoptosis. Esto se confirmó con citometría de flujo, ya que células LMM3 tratadas con HO-7-H-5 presentan un pico pre-G1. Por lo tanto, el alcaloide HO-7-H-5 podría tener interés como agente citotóxico, debido a su efecto en concentraciones muy bajas.

184. Expresión de MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) en melanomas humanos. R Wainstok¹, L Bover², Al Bravo³, A Mantovani⁴ y J Mordoh².

¹ Dept. Qca. Biológica, FCEN, UBA; ² IIB-BA, «Fundación Campomar», Buenos Aires; ³ Htal. Eva Perón, San Martín, Argentina. ⁴ Instituto «Mario Negri», Milán, Italia.

MCP-1 es una quemoquina quimioattractante de monocitos que media la infiltración de macrófagos en los tumores incluyendo melanomas. El propósito de este estudio es determinar la expresión de MCP-1 en un número extenso de melanomas humanos metastásicos y analizar la existencia de una correlación entre esta expresión, la infiltración de macrófagos y la angiogénesis tumoral. Con este propósito, se realizaron determinaciones inmunohistoquímicas sobre cortes de parafina con los siguientes anticuerpos monoclonales dirigidos contra los antígenos humanos indicados entre paréntesis: 5D3F7 (MCP-1), HAM56 (CD68) y QBEND10 (CD34). La expresión de MCP-1 fue detectada en 41 (100 %) de los melanomas metastásicos, siendo elevada (más de 50 % de células positivas) en 35 de ellos. En tres líneas celulares de melanoma humano establecidas en nuestro laboratorio, el porcentaje de células MCP-1+ varió entre 5 y 95 %..sd. Se estableció una correlación estadísticamente significativa entre el número de células MCP-1 + y el grado de neovascularización en los tumores. También se observó correlación entre el número de células MCP-1 + y la presencia de macrófagos peritumorales. Podemos concluir: 1) MCP-1 es altamente expresado por melanomas humanos metastásicos; 2) Se observó que el mayor número de células MCP-1+ se corresponde con una mayor vascularización y un mayor número de macrófagos peritumorales.

HEMATOLOGIA I

185. Trombogénesis en hemodiálisis: influencia del déficit de antitrombina III (ATIII) y de la resistencia a la proteína C activada (R.P.Ca). MA Nicastro, A Zucchini, G Correa, E Gotlieb, MM Molina, JL Plana, M Mancinelli, M Nieto.

Instituto de Investigaciones Médicas "A. Lanari". Universidad de Buenos Aires.

Se decidió evaluar la influencia de los niveles de ATIII y de la R.P.Ca en la frecuencia de fenómenos trombóticos intradiálisis (en accesos vasculares, circuito y membranas) y en el rendimiento de los filtros. Se estudiaron 61 pacientes con más de 3 meses de tratamiento dialítico, efectuándose: 1) Test de tolerancia a heparina, 2) Niveles de ATIII (sustrato cromogénico) y 3) la resistencia a la P.Ca (Dahlback et al.). En 24 pacientes se utilizaron filtros de cuprofano (CP) y en 37 de polisulfonas (PS). Todos tenían estado satisfactorio de accesos vasculares y niveles similares de hematocrito y dosis de eritropoyetina. Según los resultados obtenidos los pacientes se agruparon en: 1-ESTUDIOS NORMALES: 61% (37/61) * Trombosis: 8% (3/37). * Reuso: CU: 8.22, PS: 14.23. 2-a)TEST TOLERANCIA HEPARINA ANORMAL y -b)CON DEFICIT DE ATIII. A) 21% (13-61). B) 15% (9/61). * Trombosis a) 30% (4/13). B) 44% (4/9). * Reuso: a) CU: 5.73, PS: 12.33. b) CU: 5.69, PS: 10.66 3-PACIENTES CON R.P.Ca: 21% (13/61). * Trombosis: 27% (3/11). * Reuso: CU: 4.96, PS: 12.20. 4-PACIENTES CON DEFICIT DE ATIII Y R.P.Ca: 6.5% (4/61). * Trombosis: 50% (2/4). Hubo diferencias estadísticamente significativas en las cifras de reuso entre CU grupo 1 y grupos 2b y 3. No hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles de hematocrito y en la dosis de eritropoyetina entre los 4 grupos. Conclusiones: -Frecuencia elevada de fenotipo resistente a la proteína C activada. -La R.P.Ca tiene tanta influencia en frecuencia de trombosis como un test de tolerancia a heparina anormal o un déficit de ATIII. -La R.P.Ca influye en el reuso de los filtros, especialmente para los menos biocompatibles.

186. Efecto del shear stress sobre la respuesta leucocitaria. N Maugeri, M Nanni, AC Kempfer, MA Lazzari.

Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.

En trabajos precedentes se ha observado que los PMN de pacientes con prótesis mecánica valvulares cardíacas se hallan en un estado de preactivación. Nos propusimos analizar algunos de los factores que podrían ser los causantes, exponiendo a los PMN de individuos sanos a un shear stress equivalente al de las válvulas protésicas. Se perfundieron 3 ml de una suspensión de PMN (5×10^6 /ml) a un shear stress 6.6 dina/cm². La quimioluminiscencia (expresada en unidades arbitrarias) inducida por 5×10^{-7} M de fMLP, fue mayor en las muestras perfundidas: 28 ± 7 vs 53 ± 8 ($p=0.009$). La perfusión no produce de por sí un incremento en la expresión de CD11b (mediana de fluorescencia) sobre la superficie leucocitaria: 117 ± 30 vs 127 ± 40 , pero los hace más sensibles al efecto del fMLP: 276 ± 69 vs 441 ± 70 ($p=0.003$). La expresión de CD11b en respuesta al fMLP se vio incrementada por la presencia de U46619, 10nM (un análogo estable de TxA₂) durante la perfusión: 441 ± 70 vs 969 ± 250 ($p=0.003$), mientras que se mostró inocuo en las muestras perfundidas pero no tratadas con fMLP: 127 ± 30 vs 228 ± 70 . Los resultados sugieren que las alteraciones reológicas modifican la respuesta de los leucocitos haciéndose más evidente en presencia de TxA₂.

- 187. Efecto del anticuerpo policlonal anti-fibronectina (Fn) sobre la pérdida de los multímeros del factor von willebrand (vWf) plasmático a alta fuerza de cizallamiento.** AC Kempfer, CE Farías, MA Lazzari.

Academia Nacional de Medicina, CONICET. Buenos Aires.

La pérdida de los multímeros grandes del vWf (actividad), sin disminución de los niveles antigénicos, se observó al perfundir plasma citratado a alta fuerza de cizallamiento (13750 s^{-1} , 30 min). Esta actividad depende de las condiciones de perfusión, del pH, de la presencia de EDTA y de una sustancia plasmática que según estudios cromatográficos tendría un peso molecular ^{3200}kD . El tratamiento de plasma citratado con distintos anticuerpos anti-Fn policlonales por inmunoadsorción (Protein A-Sepharose 4B) ó inmunoprecipitación, anuló completamente la actividad. La adición de Fn preparada con Gelatin-Sepharose 4B ó comercial al plasma depletado, no restauró la actividad. Otros anticuerpos policlonales contra: IgM, α_2 -macroglobulina, haptoglobina y fibrinógeno no anularon la actividad. Al agregar a distintas alícuotas de plasma los anticuerpos monoclonales anti-Fn: clones; IST-3 (18.8 mg de IgG por ml de plasma), FN-15 (1.9 mg/ml) y FN-4 (0.4mg/ml) la actividad no se bloqueó. Concluimos que una proteína removida sólo por el anticuerpo policlonal anti-Fn mediaría la pérdida de los multímeros grandes en condiciones experimentales que mimetizan la situación hemorreológica de arterias parcialmente ocluidas.

- 188. Déficit de pool de depósito en síndromes mielodisplásicos/mieloproliferativos detectado por marcación con mepacrina.** E Bermejo, S Meschengieser, M Alberto, G Arrossagaray, N Galassi*, MA Lazzari*.

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

Los síndromes mielodisplásicos/mieloproliferativos (SMP) se caracterizan por una liberación plaquetaria de ATP francamente disminuida. La marcación con mepacrina en el citómetro de flujo permite una rápida detección del déficit de pool de depósito. Se estudiaron 23 pacientes, 7 Policitemias Vera (PV), 6 Trombocitemias Esenciales (TE), 6 Mielodisplasias (MD), 2 Leucemias Mieloides Crónicas (LMC) y 2 Mielofibrosis (MF). Se evaluó liberación de ATP en un lumiagregómetro y se marcó con mepacrina (0,1mM) en sangre entera y citratada. La lectura se hizo en un citómetro Beckton Dickinson FACScan. El valor de los normales ($n=53$) fue de $87 \pm 24\%$. Se encontró una disminución del contenido intraplaquetario de nucleótidos en 4/6 TE, 1/7 PV, 2/2 MF, 0/2 LMC y 4/6 MD. De los 11 pacientes con mepacrina disminuida, todos excepto 2 tenían liberación de ATP disminuida. La alteración de la marcación con mepacrina en los SMP parece ser más frecuente que las alteraciones en la liberación de ATP. Las patologías más afectadas son la TE, MF y MD. Una defectuosa megacariocitopoyesis explicaría la depleción observada

en MF y MD. En la TE no puede descartarse un proceso de activación y degranulación.

- 189. Respuesta plasmática a la proteína C activada (PCa). Utilidad de la prueba en presencia de plasma deficiente en factor V.** AN Blanco, C Varela, L Gennari, MA Lazzari.

Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.

Analizamos 40 individuos normales y 53 trombofilias mediante la técnica original (APCR) (APCTM Resistance, Chromogenix) y modificada (APCRm) (dilución 1:4 en plasma deficiente en factor V). En normales, no hallamos diferencias significativas entre APCR (2,40-4,16) y APCRm (2,21-3,67) y el coeficiente de correlación fue $r=0,90$. Los pacientes con trombofilia mostraron diferencias ($p<0,001$) entre APCR y APCRm. Al excluir los individuos con dicumarínicos, con inhibidor lúpico (LA) o APTT prolongado (P), las diferencias fueron no significativas, mejorando la correlación APCR-APCRm ($r=0,70$, $r=0,86$). Al igual que en normales, no observamos diferencias por sexo. En pacientes con dicumarínicos o APTT P no hallamos correlación entre APCR y APCRm; el LA afectaría ligeramente esta correlación. A diferencia de otras variables, la PS funcional mostró alguna correlación ($r=0,44$) con APCRm. 12/53 pacientes tuvieron APCRm anormal, solo 7 con APCR anormal; los dicumarínicos (2) o la presencia de LA (2) podrían explicar la discrepancia de los resultados en 4/5 casos. El LA, con o sin APTT anormal, el APTT P y los dicumarínicos modifican la respuesta a la PCa en APCR. En cambio, la resistencia a la PCa afecta la determinación funcional de PS.

- 190. Neutralización con fosfolípidos en fase hexagonal para identificar inhibidor lúpico en hemofílicos.** AN Blanco, M Candela, R Perez Bianco, MA Lazzari.

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

Los pacientes hemofílicos pueden presentar inhibidores anti-factor VIII (a-VIII) e inhibidores lúpicos (LA). El APTT es afectado por ambos inhibidores; la especificidad para el LA de la neutralización del APTT con fosfolípidos plaquetarios es discutida. En cambio, los fosfolípidos en fase hexagonal (PLHex) serían altamente específicos en la neutralización del LA. En el presente trabajo hemos evaluado un sistema comercial (Staclo[®] LA, Diagnostica Stago) que consiste en incubar el plasma problema con PLHex, agregar luego plasma normal (corrige un eventual déficit) y proceder a realizar un APTT; paralelamente se procesa un tubo donde se reemplazan los PLHex por buffer. Se considera positivo para LA una diferencia mayor de 8seg. El procedimiento se realizó en 11 plasmas de hemofílicos A: 3 con a-VIII (8-107 UB/mL) y 8 con criterios de LA (dRVVT prolongado, no corrección con plasma normal y neutralización con fosfolípidos plaquetarios). Los resultados fueron negativos para los 3 plasmas con a-VIII y positi-

vo para los 8 restantes. Estos resultados sugieren que el déficit de factor VIII, sumado a la presencia de a-VIII, no afectan la prueba de neutralización con PLHex (Staclot®LA).

191. Evaluación de la presencia de receptores para fracción constante de IgG en células endoteliales humanas por citometría de flujo. MF Alberto, El Bermejo, MA Lazzari*.

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

La evidencia de la expresión de receptores para la fracción constante de IgG (Fc gama R) en células endoteliales de vena de cordón umbilical humano de cultivo (HUVEC) es controvertida. Con el objeto de determinar la presencia de dicho receptor evaluamos la unión de IgG agregada (IgG agr) y de anticuerpos monoclonales que reconocen los tres tipos de Fc gama R expresados en leucocitos (197-FcRI, IV3-FcRII, 3G8-FcRIII), a HUVEC. Las células se utilizaron una vez alcanzada la confluencia, en el primer pasaje y fueron resuspendidas por tratamiento con tripsina. Se efectuaron estimulaciones con IL 1B (15 ng/ml) o con TNF (50 ng/ml). Se evaluó (n=5) la unión de IgGagr utilizando como sistema de marcación anti IgG humana biotina-avidina ficoeritrina. Los resultados en porcentaje de desplazamiento de fluorescencia respecto al control fueron: IgGagr 36%, FcRI 13%, FcRII 3%, FcRIII 0%. Los desplazamientos en la intensidad de fluorescencia encontrados con la IgGagr indicarían la presencia FcR gama y la evaluación de los monoclonales utilizados sugieren la presencia de FcRI.

192. Acción fibrinolítica de la heparina a través de la activación del plasminógeno mediada por uroquinasa. GE Bertolesi, EF Farias, DF Alonso, E Bal de Kier Joffé, L Lauría de Cidre, AM Eiján.

Instituto de Oncología «A.H.Roffo» y Dto. de Biología, FCEyN, Universidad de Buenos Aires.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el rol del activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) en la actividad profibrinolítica de la heparina (hep). Se estudió por desplazamiento competitivo la unión del plasminógeno (Pg) y el uPA a hep-Sepharosa. La hep se unió a ambas enzimas y aumentó la activación del Pg por uPA, observándose una curva de tipo campana, típica de la formación de complejos ternarios. Ni el heparán sulfato (HS) ni las heparinas empleadas químicamente modificadas [O y/o N-desulfatadas (des) con o sin acetilación (Ac)] presentaron actividad cofactora en la activación del Pg, a pesar de que el HS, N-des y O-des se unieron parcialmente al uPA y O-des también se unió parcialmente al Pg. O/N-desN-Ac y N-desN-Ac no compitieron por la unión del Pg ni del uPA a hep-Sepharosa. Estudios in vivo mediante la inoculación de las heparinas (0,5 mg/ratón) y el posterior análisis zimográfico de activadores de Pg presentes en la euglobulina de los ratones inoculados mostraron un aumento en las bandas de 47 y 88 kDa, correspondientes

a uPA y kalikreína respectivamente. El incremento fue máximo a las 2 horas y regresó a los niveles basales a las 6 hs post-inoculación. Estudios densitométricos de western blot anti uPA mostraron que el incremento en la actividad del uPA se correlaciona con un aumento de los niveles de uPA circulante. Mas aún, las euglobulinas de ratones tratados con las hep con afinidad por el uPA (HS, N-des y O-des) también aumentaron la banda de 47 kDa. Estos resultados sugieren que la actividad profibrinolítica in vivo de la heparina podrían deberse a un aumento real del uPA circulante, más que a una actividad cofactora vinculada a la formación de complejos ternarios.

193. Caracterización citogenética y citomolecular del clon neoplásico en síndromes mielodisplásicos. MV Castuma, S Acevedo, I Larripa.

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

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) son un grupo heterogéneo de desórdenes hematológicos, con diferente pronóstico y evolución que se caracterizan por alteraciones en la proliferación y maduración de los progenitores hematopoyéticos. En este trabajo se realizó el estudio cito-genético y citomolecular con sondas específicas en pacientes con SMD a fin de caracterizar el clon neoplásico y establecer su importancia pronóstica. Se estudiaron 25 casos: 8 AR, 2 AS, 2 AREB, 9 AREB-t y 4 LMMC. En todos los casos se realizó cultivo de médula ósea de 24 hs en medio RPMI-1640 suplementado con 15% de SFB. Los extendidos citogenéticos se procesaron con técnica de bandejo G e hibridización in situ con sondas centroméricas y/o de todo el cromosoma en los casos con cariotipo complejo. Nuestros datos muestran que el 50% de las AR y LMMC presentó alteraciones cromosómicas clonales al momento del diagnóstico, mientras que estos valores se incrementaron a un 75% en AREB y AREB-t. Las alteraciones más frecuentes fueron: del (5q)-7, del(7q), +8, del(12p), las cuales no muestran especificidad de subtipo. Los cariotipos con dos o más alteraciones clonales se detectaron preferentemente en los pacientes con diagnóstico de AREB y AREB-t indicando evolución clonal y peor pronóstico, dado que el 65% de los mismos desarrolló leucemia aguda a corto plazo.

194. Comparación de la capacidad aneugénica de dos alcaloides de la vinca. M González Cid, MT Cuello, I Larripa.

Dpto de Genética. II Hema. Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires.

Los alcaloides de la vinca son potentes citostáticos utilizados en oncología. Estas drogas actúan sobre las fibras del huso mitótico, alterando la distribución de los cromosomas durante la división, produciendo aneuploidía y muerte celular. Se evaluó y comparó la capacidad aneugénica de dos vinca-alcaloides: vinorelbina (VRB) y vincristina (VCR) de similar espectro antitumoral. Se analizó la presencia de micro-núcleos (MN) en cultivos

de sangre periférica y de anafases-telofases anormales en la línea celular CHO. Los linfocitos y las células CHO se trataron con VRB y VCR a las dosis de 0,05; 0,1; 0,5 ó 1 µg/ml y de 0,01; 0,05; 0,1 ó 0,5 µg/ml, respectivamente, para ambas drogas. Se observó un aumento significativo ($p < 0,001$) en las frecuencias de MN entre los cultivos de linfocitos tratados con VRB y VCR y los controles (%MN = $4,3 \pm 0,7$). A la dosis más alta el valor de MN fue de $30,8 \pm 5,8\%$ para VRB y de $220,3 \pm 9,7\%$ para VCR ($p < 0,001$). En CHO se detectó un incremento significativo ($p < 0,001$) en las frecuencias de anafases anormales con respecto a los controles ($5,7 \pm 0,4\%$), alcanzando un valor de $35,0 \pm 7,5\%$ para VRB y $56,6 \pm 6,0$ para VCR a la dosis de 0,5 µg/ml ($p < 0,001$). Nuestros datos indican que VRB posee un menor efecto aneugénico que VCR, sugiriendo un menor riesgo carcinogénico en los individuos tratados.

195. Marcadores de activación plaquetaria (PDGF y TXB₂) en trombocitemia esencial (TE).
M.S.Laguna, R.F.Marta, L.I.Kornblihtt, M.A. Gargiulo, F.C.Molinas.

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

En la TE existen evidencias de activación plaquetaria (agregación espontánea, aumento β -TG), sin embargo, sus mecanismos aún no son claros. Evaluamos en 13 pacientes con TE los niveles plasmáticos de los marcadores de activación plaquetaria PDGF y TXB₂ (ELISA) antes y durante el tratamiento con anagrelide (imidazolinazolin). Recuento de plaquetas inicial ($\times 1000/\mu\text{l}$): 986 (476-1879) (mediana y rango). Se halló aumento de los marcadores de activación en 9/13 pacientes previo al tratamiento y los niveles totales fueron: PDGF, 4.92 (1.89-19.04) ng/ml (VN 1.55(0.99-4.46)); TXB₂, 10.46 (0.52-97.07) ng/ml (VN 0.63 (0.44-0.97)). Presentaron agregación espontánea 5/13 casos. Durante la remisión los valores descendieron: recuento de plaquetas ($\times 1000/\mu\text{l}$) 423 (174-588); PDGF, 2.20 (1.66-3.14) ng/ml ($p < 0,02$, Wilcoxon) y TXB₂ 3.06 (0.38-6.31) ng/ml ($p < 0,03$); agregación espontánea 1/13 casos. No se halló relación entre estas alteraciones plaquetarias y las manifestaciones clínicas de la TE. Concluimos que estos pacientes con TE tienen aumento de los marcadores de activación plaquetaria, que tienden a normalizarse cuando están en remisión de la enfermedad por el tratamiento.

196. Factores de crecimiento hematopoyéticos y citoquinas en la fiebre hemorrágica argentina (FHA). RF Marta, D Enria, FC Molinas.

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, UBA e INEVH, Pergamino, Buenos Aires.

Los pacientes con FHA presentan en la fase aguda de la enfermedad hipoplasia severa de la médula ósea con leucopenia pero no anemia y aumento sérico de TNF- α . Se sabe que esta citoquina tiene efecto inhibitorio sobre la proliferación de progenies eritroides y bifuncional sobre las granulocíticas. Presentamos aquí los niveles de

eritropoyetina (Epo), factor estimulante de colonias granulocítico(G-CSF), granulocito-macrofágico(GM-CSF), interleuquina 3 (IL-3) y TNF- α (ELISA), en muestras del ingreso de pacientes con FHA: 14 forma grave (FG), 14 forma moderada (FM) y 21 forma leve (FL). Los resultados en las FG, FM y FL fueron respectivamente: Epo, 3.7 mUI/ml (0.6-198.4) (mediana y rango), 0.7 mUI/ml (0.6-9.7) y 2.2 mUI/ml (0.6-8.9) (VN 3.1-16.6); G-CSF, 284.2 pg/ml (55.6-98306), 73.9 pg/ml (15-1240) y 66.7 pg/ml (17.9-177.3) (VN < 78.1). Se halló aumento de GM-CSF e IL-3 sólo en 1 y 2 pacientes respectivamente. Los valores de TNF- α , similares a los ya publicados, se correlacionaron con los niveles de G-CSF ($p < 0,001$) pero no con la Epo. En conclusión, estos pacientes tienen disminución de EPO, salvo algunos graves, y aumento de G-CSF que se correlacionó con el TNF- α .

NEUROCIENCIAS II

197. Papel de los receptores histaminérgicos de hipocampo en la regulación de la motivación y la emocionalidad en la rata. EO Alvarez, MB Ruarte.

Unidad de Farmacología del Comportamiento, Cátedra de Farmacología y Física Biológica, Facultad de Ciencias Médicas, UNC, Mendoza. Evidencias preliminares han mostrado que la histamina (HA) en el hipocampo ventral inhibe la exploración de un laberinto en cruz-elevado-asimétrico (LCEA). El objetivo del presente trabajo fue caracterizar farmacológicamente esta respuesta e identificar los receptores involucrados. Se trabajó con ratas macho adultas que se implantaron unilateralmente con cánulas de microinyección en el hipocampo ventral. 72 hr después los animales se inyectaron con 9,45 o 90 nmol de HA. En otros experimentos, se les administró además 45 nmol de pirilamina o ranitidina. Salino se usó como control. 15 min después de la microinyección los animales se estudiaron en el LCEA. Los resultados mostraron que en uno de los brazos ansiogénicos HA (9 nmol) disminuyó significativamente la exploración (índice de motivación; 18 ± 20 cuentas vs 93.5 ± 11 , HA vs SAL, $p < 0,05$) sin cambios en la permanencia (índice de emocionalidad). En uno de los brazos menos ansiogénicos, HA también inhibió la exploración, aumentando significativamente la permanencia (197.5 ± 24 vs 8 ± 37 cuentas; HA vs SAL, $p < 0,01$). Ambos efectos fueron bloqueados por los antagonistas histaminérgicos. Los resultados sugieren que HA en el hipocampo regula la motivación y la emocionalidad.

198. Anormalidades eléctricas cerebrales asociadas a defectos de aprendizaje en ratas expuestas a plomo a baja dosis. AA Yorío, AP Lemoine, JC Brum, ET Segura.

Laboratorio de Biología del Comportamiento. IBYME. CONICET. Buenos Aires.

Son objetivos del presente trabajo examinar efectos de exposición prologada en ratas sobre open-field (OF),

evitación pasiva (EP), potencia EEG (pEEG) y potenciales relacionados con eventos (PRE). Fueron estudiados 4 grupos de 6 ratas machos Sprague Dawley que recibieron en agua de bebida: acetato de plomo 26 mM, 13 mM, 1 mM y agua corriente. Al sexto mes se practicaron las pruebas, registros y determinaciones de plomo en sangre (Pbs) y tejidos (Pbt). Los resultados mostraron diferencias significativas en OF (deambulacion interna, $F=4.32$, $P<0.05$); EP (latencia al step-through, $F=6.23$, $P<0.05$); pEEG (banda theta, $F=8.2$, $P<0.01$) y PRE (latencia componente positivo tardío, $F=7.92$, $P<0.01$). Se evidenciaron correlaciones entre Pbt y pEEG theta ($r=0.49$, $P<0.05$) y entre latencias EP y PRE ($r=0.57$, $P<0.02$). Se concluye que niveles tisulares de plomo se asocian a anomalías conductuales y de la actividad eléctrica cerebral relacionadas.

199. Asimetrías en el procesamiento del espacio en una población de monos Cebus apella. S Lipina, M Diquattro, VG Frak, JA Colombo.

PRUNA (CEMIC-CONICET). Avda. Galván 4102 (1431) Buenos Aires.

El análisis de las estrategias de procesamiento de la información por el SNC constituye un tema de interés central en neurociencia. El objetivo del trabajo es obtener descriptores poblacionales referidos a tal procesamiento. A 9 monos Cebus apella, machos adultos, se les administraron las pruebas de alcance directo (AD) (predominio manual), de respuesta retardada (RR) y AB de Piaget con y sin retardo (RR 0", AB 0", AB 2") en sesiones diarias de 20 ensayos durante 5 meses. RR y AB de Piaget evalúan procesamiento prefrontal. Se calcularon las sesiones necesarias para alcanzar 90% de eficiencia (total de ensayos correctos/total de ensayos) a izquierda (+) y a derecha (-). Resultados. En RR 0": 4 monos con resolución espacial a izquierda, 3 a derecha y 2 simétrica; en AB 0": 2 monos a izquierda, 2 a derecha y 5 simétrica; en AB 2": 3 monos a izquierda, 2 a derecha y 1 simétrica; AD: 3 monos con preferencia manual derecha y 6 izquierda. Conclusiones. Los resultados indican una distribución bimodal en el tiempo necesario para alcanzar máxima eficiencia en la búsqueda a derecha e izquierda. Ello sugiere una asimetría del procesamiento que no se relaciona necesariamente con la preferencia manual observada. Estos datos sugieren una estrategia oportunística en las pruebas de resolución espacial. Agradecimientos: Fundación CONECTAR, Bolland SA, Petrolera Argentina San Jorge, CIRHA, CONICET.

200. Estudio de la representación cortical de músculos proximales y distales en voluntarios sanos. M Miranda, REP Sica, MJ Segura.

División Neurología, Laboratorio de Fisiología cortical, Htal R Mejía, Buenos Aires

OBJETIVOS: Estudiar la representación cortical motora de grupos musculares proximales y distales durante una contracción voluntaria normalizada, y la correlación entre la latencia y amplitud de los potenciales

musculares correspondientes. **MATERIAL Y MÉTODOS:** Estudiamos 10 voluntarios sanos (8 masc.; edad: 29.4 ± 8.72 años) mediante mapeo cortical de los músculos deltoides y ADM (Aductor Dígiti Minimi). Empleando estímulos magnéticos únicos se excitaron 16 posiciones corticales, separadas por intervalos de 2 cm a ambos lados del plano biaural, con una intensidad 10 % supraumbral. El registro se realizó sobre las zonas de placa de los músculos deltoides y ADM contralaterales durante una maniobra de contracción voluntaria normalizada, obteniéndose de 3 a 5 respuestas por músculo y punto de estímulo. **RESULTADOS:** El área de Deltoides fue predominantemente medial-anterior y de ADM latero-posterior (26cm^2 c/u), con un gradiente de amplitud en el plano mediolateral decreciente para deltoides y creciente para ADM. Las latencias y amplitudes de las respuestas motoras del músculo deltoides evocadas estimulando diferentes puntos del mapa motor mostraron una correlación negativa estadísticamente significativa ($r=-0.42$; $p=0.003$). Contrariamente, en ADM dicha correlación no fue significativa ($r=0.15$ $p=N.S$). **CONCLUSIÓN:** La técnica empleada permite comparar mapas motores funcionales de sujetos con diversos umbrales y discriminar diferentes territorios musculares. En el mapa motor de deltoides, los puntos con mayor «densidad» de representación coinciden con poblaciones de motoneuronas corticales predominantemente «rápidas», mientras que este perfil no se reproduciría en ADM.

201. Comportamiento del sistema simpático en relación al tipo de cefalea y a la edad. ML Figuerola*, G Levin*, J Leston#, M Barontini.

*CEDIE, Htal de Niños R Gutiérrez, #División Neurología, Htal de Clínicas. Buenos Aires.

En pacientes con cefalea tipo tensión crónica (CTT) tanto mayores como menores de 60 años hemos encontrado niveles elevados de met-enkefalina (ME) plasmática con respecto a los que presentan pacientes migrañosos (M) de los mismos grupos etarios, sin modificación en los niveles de ME en neutrófilos. A fin de determinar si la fuente responsable de tal aumento son las estructuras del SNS, donde la ME co-almacena y colibera con las catecolaminas, se determinaron por HPLC las concentraciones plasmáticas de adrenalina (A), noradrenalina (NA), dopamina, dihidroxifenilglicol, dihidroxifenilalanina y ácido dihidroxifenilacético, en 10 sujetos menores de 60 años (j) y 9 mayores de 60 años (s), divididos a su vez en dos grupos: CTT y M. No se observaron diferencias significativas en A: jCTT 26 ± 9 ; jM 25 ± 5 ; sCTT 20 ± 3 ; sM 29 ± 4 (pg/ml); NA: jCTT 504 ± 89 ; jM 423 ± 63 ; sCTT 320 ± 9 ; sM 539 ± 198 (pg/ml) ni en ninguno de los otros parámetros evaluados al compararlos por patología ni al hacerlo por grupo etario. De los datos obtenidos se concluye que el incremento plasmático de ME en la CTT no parece provenir de la medula adrenal ni de otras estructuras del SNS. Este proyecto ha sido realizado con un subsidio de la Sandoz Foundation for Gerontological Research.

- 202. Respuesta opioide a la inyección local terapéutica en pacientes con fibromialgia.** ML Figuerola*, W Loe*, D Estomba*, A Mónaco*, MN Sormani*, M Barontini*.

*CEDIE, Htal de Niños R Gutiérrez, *Sec Reumatología Htal Rivadavia, *Div Neurología, Htal de Clínicas. Buenos Aires.

Para evaluar el efecto sobre la met-enkefalina plasmática (ME) del tratamiento con inyección local seriada de lidocaína en los puntos dolorosos de pacientes con fibromialgia reumática, se estudiaron 10 pacientes, 5 bajo tratamiento con lidocaína (A) y 5 con aguja seca (B) en dichos puntos dos veces por semana. Los pacientes fueron evaluados la 1ra, 3ra y 5ta sesión y las muestras obtenidas inmediatamente antes, después y 10 minutos luego de finalizar cada sesión. La ME fue determinada por anticuerpo específico y expresada en pmol/ml, $X \pm SEM$. Los niveles basales en las tres sesiones fueron similares en ambos grupos (A: 0.17 ± 0.01 , 0.15 ± 0.02 y 0.13 ± 0.01 y B: 0.14 ± 0.01 , 0.17 ± 0.01 y 0.16 ± 0.02 respectivamente) y permaneció sin cambios después de finalizada la sesión. Observamos un aumento significativo en ambos grupos en la 3era muestra de cada sesión (A: 0.23 ± 0.02 , 0.21 ± 0.02 y 0.21 ± 0.01 $p < 0.01$ y B: 0.26 ± 0.04 , 0.25 ± 0.04 y 0.26 ± 0.02 $p < 0.01$). Estos resultados muestran un aumento de ME con ambos procedimientos que es independiente de la administración de lidocaína.

- 203. Enfermedad de Parkinson y tratamiento con L-dopa: efectos distrofiantes del LCR y modificación por la astrogliá.** MI Napp, JA Colombo, F Micheli, V Wendel.

PRUNA (CEMIC-CONICET). Avda. Galván 4102 (1431) Buenos Aires.

Metabolitos de la dopamina y L-dopa son deletéreos para las células nerviosas. Objetivos: analizar en cultivos celulares, el efecto distrofiante del líquido cefalorraquídeo (LCR) en la enfermedad de Parkinson (EP) tratada, y la acción de la astrogliá sobre aquel. Materiales: LCR de controles no parkinsonianos (N=3) y con EP, con (N=8) o sin (N=3) tratamiento con L-dopa. Células blanco: disociados regionales de cerebro de rata (E 17) o de mono (E 93) y astrogliá fetal de rata, subcultivada. Diseño: 1. Efecto agudo sobre células sin adyuvantes tróficos. 2. Idem, con estimulación trófica previa. Criterios de evaluación: porcentaje de células emisoras y longitud de emisiones a las 24 hrs de cultivo. Estadística: ANOVA, X2. Resultados: a) los LCRs provenientes de pacientes con EP, tratados con L-dopa, resultaron distrofiantes o menos tróficos que los controles, b) el LCR trófico (N=1) de un paciente no tratado con L-dopa, luego del tratamiento resultó distrófico, c) este efecto distrofiante fue revertido por incubación del LCR durante 24 hrs con astrogliá fetal de rata. Conclusiones: 1) el tratamiento con L-dopa no genera condiciones favorables para la regeneración neuronal, 2) la astrogliá es un factor modificador del LCR distrofiante, 3) es fundamental considerar el efecto del LCR sobre el neuropilo

al intentar terapias de trasplante en la EP. Agradecimientos: Bolland SA, Fundación CONECTAR, CEE.

- 204. Análisis molecular de delecciones genéticas que producen la distrofia muscular de Duchenne.** SE Baranzini, F Giliberto e I Szijan.

Cátedra de Genética y Biología Molecular. FFyB. UBA. Laboratorio de Neurobiología Molecular. Hospital de Clínicas "José de San Martín". Buenos Aires.

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una de las patologías hereditarias más frecuentes (1:3300). La enfermedad alélica, la distrofia muscular de Becker es menos frecuente y más benigna. En la gran mayoría de los casos el defecto molecular primario reside en una alteración en el gen que codifica para la distrofina. Esta proteína muscular es de gran importancia para el mantenimiento estructural del sarcómero. Si bien la alta complejidad y gran tamaño de este gen complica el estudio de las alteraciones, actualmente se dispone de métodos de diagnóstico molecular que permiten identificar por encima del 98 % de las delecciones que producen esta patología. Este estudio permite confirmar el diagnóstico clínico y facilitar el estudio de portadoras. Por medio de PCR multiplex, inicialmente, y amplificación individual de hasta 56 de los 79 exones que componen el gen de la distrofina, se detectaron 10 delecciones en 40 familias estudiadas con al menos un afectado. Los tamaños de las delecciones variaron entre 1 y 33 exones. En análisis de estas delecciones permitió el diagnóstico de 2 de los afectados como distróficos del tipo Becker. En un caso el diagnóstico molecular se realizó con anterioridad a las manifestaciones clínicas.

ENDOCRINOLOGIA V

- 205. Metabolismo intracelular del complejo $\alpha 2$ -macroglobulina-monofluorofosfato ($\alpha 2$ M-MFP) en la rata.** L Esteban, A Rigalli, RC Puche

Laboratorio de Biología Osea. Facultad de Medicina. Rosario.

Después de una dosis oral de MFP, una fracción de la droga se liga a $\alpha 2$ M. El complejo es eliminado por receptores «scavenger» de hígado y hueso. Este trabajo investiga el metabolismo intracelular del complejo $\alpha 2$ M-MFP. La incubación de slices de hígado de rata con $\alpha 2$ M-MFP tuvo dos etapas: captación del complejo ($k = 0.78 \pm 0.25 \text{ min}^{-1}$) y recirculación de flúor (F) ligado a un péptido de PM 2200 ± 700 . La incubación del complejo con slices de hígado en presencia de $10 \mu\text{M}$ colchicina no afectó la captación (control; $k = 0.83 \pm 0.3 \text{ min}^{-1}$, colchicina: $k = 1.57 \pm 0.75 \text{ min}^{-1}$) pero disminuyó la recirculación (Control 62.1% del F inicial vs. Tratados = 1.9%). El contenido de F de los slices fue $17.3 \mu\text{mol/g}$ vs. controles = $7.7 \mu\text{mol/g}$. La preincubación del tejido con metilamina (MA), no afectó la captación (MA: $k = 0.67 \pm 0.12 \text{ min}^{-1}$; control, $k = 0.73 \pm 0.3 \text{ min}^{-1}$) pero disminuyó la recirculación (49.8% de los controles). La recirculación de F ligado a un péptido y el efecto de MA sugieren participación de los lisosomas en la digestión

del complejo. El efecto de la colchicina implica internalización microtubular de $\alpha 2\text{M}$ -MFP.

206. Metabolismo extracelular de los complejos $\alpha 2$ -macroglobulina-MFP y C3-MFP en ratas y seres humanos. A Rigalli, L Pera, L Esteban, RC Puche.

Laboratorio de Biología Osea y Cátedra de Ginecología, Facultad de Medicina. Rosario.

Después de una dosis oral de MFP, una fracción de esta droga se liga a la $\alpha 2\text{M}$ y C3. Hemos demostrado que el complejo es captado del espacio extracelular por hígado y hueso de rata mediante incubación de esos tejidos con el complejo $\alpha 2\text{M}$ -MFP. A los 60 minutos los slices liberan fluoruro y fíndor ligado a un péptido de peso molecular 2200 ± 700 . Seis sueros de pacientes que recibieron tratamiento crónico con MFP fueron fraccionados en columnas de Sephadex G50 y G100. Se observaron tres fracciones de fluor: 1) fluor ligado a proteínas de PM 180000, 2) fluor ligado a péptido/s de PM 2200 ± 700 (péptido de 18"6 aminoácidos) y 3) fluor iónico. En la orina de estos pacientes, el fluor total (medido por destilación) y el único (medido directamente con el electrodo) no difirieron significativamente (F total= 33.73 ± 26.3 ; $\mu\text{moles/d}$, F único= 21.3 ± 8 , $n=6$; $p>0.05$). Conclusión: El MFP ligado a proteínas es metabolizado rápidamente a fluoruro y fluor ligado a un péptido de bajo peso molecular.

207. Involución no apoptótica producida por norgestrel (NG) en prolactinomas estrógeno-dependientes de ratas F₃₄₄. G Piroli*, A Torres*, C Grillo*, A Aoki* y AF De Nicola*.

**IBYME-Fac. Medicina, Universidad de Buenos Aires, y *Centro de Microscopía Electrónica, Fac. Ciencias Médicas, UNC.*

Ratas F₃₄₄ tratadas con dietilestilbestrol (DES) desarrollan adenomas prolactínicos denominados DES-T. Demostramos previamente que la progesterona antagoniza el crecimiento de los DES-T. En esta oportunidad utilizamos progestágenos sintéticos, cuyas IC₅₀ in vitro por receptores progestínicos de DES-T fueron: gestodeno = $R5020 = \text{NG}$ ($2 \times 10^{-6}\text{M}$) > proges-terona=acetato de noretisterona=acetato de medroxi-proges-terona ($2 \times 10^{-6}\text{M}$). De los progestínicos de mayor afinidad, el NG resultó el menos tóxico. Se indujeron DES-T en hembras F₃₄₄ ovariectomizadas, mitad de las cuales recibió luego de 2 semanas un pellet de NG de 12 mg, y 4 semanas más tarde fueron sacrificadas. Los pesos hipofisarios fueron: DES-T = $99.3 \pm 3.3\text{mg}$ y DES-T+NG= $60.8 \pm 1.0\text{mg}$ ($p<0.001$). En DES-T observamos hipertrofia e hiperplasia de lactotropas (80% de la población celular) con gran desarrollo del RER, además de involución de gonadotropas y somatotropas. En DES-T+NG se observaron células hipertróficas con desarrollo del RER pero paralelamente aumentó la proporción de células en involución y en degeneración con alteraciones de las organelas citoplasmáticas y alta densidad electrónica, sin

condensaciones apoptóticas de la cromatina de acuerdo a criterios de microscopía electrónica. Se concluye que la disminución del tamaño tumoral por NG se acompaña de un incremento en la muerte celular por un mecanismo no apoptótico.

208. Caracterización de SHBG sérica en la Hipertricosis Prepuberal Idiopática. P Bedecarrás, M Gryngarten, ME Escobar, S Ayuso, S Campo.

Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Hosp. de Niños, R. Gutiérrez, Buenos Aires.

En un estudio previo hemos descripto el perfil de isoformas de SHBG circulantes en niñas prepuberales según sus puntos isoelectrónicos (pI): SHBG I, pI:5.2-5.4: $8.8 \pm 3.1\%$; SHBG II, pI:5.4-5.6: $58.8 \pm 12.6\%$ y SHBG III: pI:5.6-5.8: $31.8 \pm 0.1\%$ (media $\pm$ DS de la distribución porcentual de isoformas recuperadas en isoelectroenfoque preparativo). En el presente trabajo hemos estudiado la distribución de isoformas de SHBG circulantes en cinco niñas con hipertricosis prepuberal idiopática (HPI) que presentan niveles plasmáticos de andrógenos y SHBG normales. Las pacientes presentaron isoformas con pI: 4.8-6.0 y cambios en la proporción de las isoformas circulantes: SHBG I: $43.7 \pm 10.8\%$ ($p<0.001$) y SHBG III: $13 \pm 4.4\%$ ($p<0.05$). La estructura de la cadena carbohidratada interna al ácido siálico se evaluó usando cromatografía en Concanavalina A. Se aislaron isoformas no retenidas (NR: tri- tetraantenarias, eluidas con buffer de equilibrio), isoformas débilmente retenidas (DR, biantenarias y truncadas, 15 mM de α -D manopiranosas) e isoformas fuertemente retenidas (FR, 100 mM de α -D manopiranosas). Se detectaron isoformas NR en las pacientes ($14.4 \pm 9.0\%$) las cuales están ausentes en el grupo control. Nuestros resultados muestran que en la HPI hay un aumento en la heterogeneidad de SHBG circulante; aparecen isoformas con posibles alteraciones en la estructura de sus cadenas de carbohidratos y un contenido de ácido siálico terminal diferente al observado en condiciones fisiológicas.

209. ¿Se modifica el polimorfismo de FSH sérica en el hombre sano después de los 50 años? VG Fernández, S Creus, H Benencia, S Campo.

CEDIE, Hosp. de Niños R. Gutiérrez; Depto. Bioquímica Clínica, Fac. Ccia. y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

La fertilidad en el hombre persiste por más tiempo que en la mujer en la cual la menopausia marca el final de su período fértil. Sin embargo, se ha descripto con la edad una declinación de la actividad de la gonada masculina. El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar el polimorfismo de la inmuno-FSH circulante en hombres sanos, mayores de 50 años. Se estudiaron: hombres menores de 35 años, de probada fertilidad ($n=5, C$), hombres entre 50 y 60 años ($n=6, A$), y hombres entre 60 y 70 años ($n=6, B$). El nivel de FSH en suero fue significativamente más elevado en el grupo B ($23.2 \pm 10.2\text{UI/L}$)

respecto de A y C (3.9 ± 2.3 UI/L y 2.4 ± 2 UI/L; $p < 0.01$). La FSH fue aislada en isoelectroenfoque preparativo y aplicada a columna de Concanavalina-A. El rango de enfoque (pI) de FSH fue similar en los tres grupos: C: 3.9-5; A: 3.2-5; B: 3.5-5. Sin embargo, en C la proporción de FSH con pI entre 3-4 fue significativamente menor que en los grupos A y B ($20.3 \pm 0.9\%$ vs $39.6 \pm 16\%$ y $41.3 \pm 14\%$; $p < 0.01$). El perfil de distribución de las isoformas según la estructura de las cadenas de oligosacáridos fue similar en A, B y C. La FSH circulante se distribuyó en proporción semejante entre isoformas con cadenas complejas, de alto grado de ramificación ($39.7 \pm 9\%$) e isoformas con cadenas de tipo biantenarico y truncadas ($44.9 \pm 11\%$). Solo una pequeña proporción de inmunoreactividad ($10 \pm 5\%$) correspondió a isoformas con cadenas de tipo híbrido y alto contenido en manosa. Nuestros resultados muestran que los cambios descriptos en la función gonadal masculina que se producen con la edad, no modifican significativamente el polimorfismo de FSH. Solo se incrementa la permanencia de la hormona en circulación. Este trabajo fue realizado con un subsidio de Sandoz Foundation LA95-1-13.

210. Mutaciones e el proto-oncogen RET en una familia con neoplasia endocrina múltiple (MEN-2B). G Sansó, HM Domené, M Barontini.

Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE), Hospital de Niños «R. Gutiérrez», Buenos Aires.

El MEN 2B es un síndrome genético que presenta carcinoma medular de tiroides (MTC), feocromocitoma, neuromas de las mucosas, ganglioneuromas intestinales y hábito marfanóide, heredándose con carácter autosómico dominante. En más del 94% de los casos reportados, se encontró una transición de T a C en el codón 918 del proto-oncogen RET, produciendo una sustitución de Metionina por Treonina. Con el objeto de caracterizar mutaciones del codón 918 del proto-oncogen RET se estudió una paciente con diagnóstico clínico de MEN 2B y sus padres. A los 7 años se extirparon múltiples neuromas bucales, a los 19 años se extirparon tiroides y suprarrenales por presentar MTC y feocromocitoma bilateral. Se obtuvieron muestras de ADN de sangre de la paciente y sus padres, y de tejido de feocromocitoma congelado de la paciente. Se utilizó PCR para amplificar un fragmento de 192 bp del exón 16 del proto-oncogen RET. El fragmento purificado fue analizado por secuenciación. En muestras de sangre y de feocromocitoma de la paciente se observó una doble mutación en el codón 918, la que resultaría en una sustitución de Metionina por Prolina no descripta previamente. Estas mutaciones se heredarían del alelo materno ya que la madre presenta las mismas mutaciones y el padre solo el alelo normal. La falta de signos clínicos evidentes en la madre podría deberse a una expresión variable del síndrome.

211. Importancia relativa del a glucosa, insulina y hormona paratiroidea como determinantes de

la fosfatúria de la rata diabética por aloxano (RDA). ME Locatto, V Di Loreto, MC Fernández, D Caferri y RC Puche.

Laboratorio de Biología Osea, Facultad de Medicina, Rosario.

El objetivo de este trabajo es investigar la importancia relativa de PTH, insulina y glucosa (G), en la hiperfosfatúria de ratas crónicamente diabéticas. La excreción fraccional de fosfato (P)(EFP) aumentó en RDA (0.47 ± 0.12 vs. Controles = 0.05 ± 0.01 , $P < 0.001$) y se normalizó con insulinemias del orden de $1250 \mu\text{UI/ml}$ obtenidas por administración de altas dosis de la hormona. La PTH de las RDA no pesó como determinante de la hiperfosfatúria, que aumentó postparatiroidectomía. Las reabsorciones de G y P, medidas con experimentos de clearance en 5 modelos experimentales: controles (C), controles + glucosa (C+G), diabéticos (D), diabéticos + insulina (D+I) y diabéticos + insulina+glucosa (D+I+G), se correlacionaron significativamente: la relación molar P:G reabsorbidos fue 1 ± 4 cuando la glucemia < 11 mM (grupos C y D+I) y 1 ± 20 con glucemias > 25 mM (D, C+G, D+G+I). La hiperfosfatúria de las RDA es consecuencia del aumento en la oferta tubular de G. La insulina actúa indirectamente al normalizar la glicemia.

212. Efecto del aluminio sobre el transporte intestinal de calcio en ratas diabéticas. D Orihuela*, CE Carnovale, MC Carrillo

**Cátedra Fisiología Humana, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral. Instituto de Fisiología Experimental, CONICET, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.*

Se estudió la acción del aluminio (AL) sobre la absorción intestinal de calcio en un modelo animal de diabetes mellitus experimental. Métodos: ratas Wistar macho adultas fueron inyectadas con streptozotocina (STZ) 50 mg/kg i.v., dos días después se dividieron en tres lotes que recibieron respectivamente: salina normal, Insulina NPH ($10 \text{ UI/kg/día s.c.}$) y $1,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$ ($0.10 \text{ mg/kg/día s.c.}$). El grupo control (C) recibió vehículo de STZ. Al cabo de diez días se midió el flujo de calcio mucosa-serosa (JCa_{ms}) en los sacos duodenales evertidos usando ^{45}Ca como marcador en presencia de 0, 2, 5 y 10 mM de Cl_3AL en el medio mucosal. Resultados: los parámetros dosis-respuesta de las curvas % reducción JCa_{ms} (E) vs. $[\text{AL}]$ (D) disminuyeron significativamente en el grupo STZ respecto del control (E_{max} : $C = 41.5 \pm 5.7\%$, $\text{STZ} = 22.4 \pm 4.1\%$; ED_{50} : $C = 3.81 \pm 0.38$, $\text{STZ} = 0.14 \pm 0.08 \text{ mM}$, $n = 6$, $p < 0.01$). El tratamiento con insulina normalizó estos parámetros. En el grupo de ratas diabéticas inyectadas con $1,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$ tanto E_{max} como ED_{50} aumentaron respecto de las diabéticas no tratadas, aunque sin alcanzar los valores del lote control. Conclusiones: se infiere que: a) La inhibición por el AL del transporte de calcio duodenal en las ratas diabéticas es dependiente de la $1,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$, b) La acción normalizadora de la insulina sobre E_{max} y ED_{50} podría ocurrir, en parte, a través de la

elevación del nivel sérico de la $1,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$, que se encontraría disminuido en los animales diabéticos.

- 213. Refuerzo de la estructura diafisaria femoral de ratón por dosis altas de olpadronato (OLPA).** V. Peluffo, M. Parma, N. Mondelo, G. Cointry, J.L. Ferretti.

CEMFOC, UNR, Rosario; IDIM-FIM Buenos Aires, y Depto. Farmacología Experimental, Gador S.A., Buenos Aires.

Para describir sus efectos biomecánicos óseos, se administraron dosis de 0, 40, 60 ó 90 mg/kg/d p.o. de OLPA, bifosfonato de producción local, a grupos de ratones hembra de 4-5 semanas ($n=7, 6, 10, 8$) durante 3 meses. Sus diáfisis femorales se escanearon luego por tomografía computada periférica (pQCT) y se ensayaron en flexión. El tratamiento mejoró la resistencia diafisaria a la fractura ($p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$), aunque no a la deformación, por aumentar el área y el momento de inercia de la sección (CSMI, $p<0.001$ siempre) y la densidad mineral volumétrica del hueso cortical ($p<0.01$, $p<0.01$, $p<0.05$), aunque redujo la calidad mecánica del material óseo (módulo de elasticidad, E , $p<0.01$, $p<0.05$, $p<0.001$) respecto del control. El OLPA estimuló indudablemente la modelación ósea en estas condiciones. No hay referencias de estímulo osteoblástico directo por bifosfonatos, pero sí de efectos anabólicos indirectos in vivo, vía estímulo paratiroideo. En congruencia con esto, la mejor relación entre eficiencia arquitectónica seccional (CSMI, mejorada) y rigidez intrínseca de material cortical (E , reducida) sugiere una interacción anabólica del tratamiento con el punto de referencia del control mecánico de la modelación (mecanostato). Este efecto, producido sin deteriorar la mineralización aún a altas dosis, es interesante para el tratamiento de osteopatías fragilizantes humanas.

- 214. Ensayo tomográfico de efectos puros o combinados de hPTH (1-32) y de los bisfosfonatos (BP) pamidronato y olpadronato (APD, OLPA) en fémur de rata.** G. Cointry, N. Mondelo, E. Montuori, J.L. Ferretti.

CEMFOC, UNR, Rosario; IDIM-FIM, Buenos Aires, y Depto. de Farmacología Experimental, Gador S.A., Buenos Aires.

Antes demostramos efectos óseos complementarios del tratamiento secuencial hPTH/BP en ratas. Ahora, 6 grupos de 4 ratas macho de 3 meses recibieron 150 $\mu\text{g/kg/d s.c.}$ de hPTH (1-32) ó 40 mg/kg/d orales de APD ó OLPA; ó PTH simultánea con cada BP, o ningún tratamiento por 4 semanas. Uno de sus fémures fue escaneado por tomografía computada periférica (pQCT) para determinar área seccional (A), calidad arquitectónica (momentos de inercia axial y polar, $x\text{MI}$, $p\text{MI}$) y contenido y densidad mineral volumétricos ($v\text{MC}$, $v\text{MD}$) diafisarios. Todos los tratamientos aumentaron $v\text{MD}$ ($p<0.001$). La PTH aumentó $v\text{MC}$ pero no A , $x\text{MI}$ ni $p\text{MI}$. Ambos BPs (OLPA > APD) mejoraron $v\text{MC}$ y A más notablemente junto con PTH (siempre $p<0.05$). Un

índice no-invasivo de resistencia ósea ($p\text{MI} \times v\text{MD}$), validado antes para fémur en flexión, mejoró con ambos BPs y más aún agregando PTH sola. Las correlaciones $p\text{MI}$ (y) vs $v\text{MD}$ (x ; curvas "distribución/calidad") mostraron zonas gráficas representativas para PTH a la derecha, y para BPs solos o combinados a la derecha y arriba. Estos resultados (a) muestran que la PTH mejoró anabólicamente la mineralización y ambos BPs mejoraron anti-catabólicamente la mineralización, la masa y la arquitectura óseas, potenciados por la PTH; y (b) apoyan el tratamiento combinado PTH/BP de osteopatías fragilizantes humanas con argumentos biomecánicos.

- 215. Análisis no invasivo de la estructura ósea en humanos: I. equivalencia biomecánica de los esqueletos humanos femenino y masculino.** Ferretti J.L., Capozza R.F., Schiessl H., Braun M., Schneider P.

CEMFOC (CIUNR-CONICET), Facultad de Medicina, UNR, Rosario; IDIM-FIM, Bs.As.; Stratec Medizintechnik, Pforzheim, y Klinik für Nuklearmedizin, Universität Würzburg, Alemania.

Se determinaron contenido y densidad mineral trabeculares; densidad mineral cortical (CtD, indicador de rigidez intrínseca); área y contenido mineral cortical y total (indicadores de resistencia a compresión); momentos de inercia seccionales axial y polar ($x\text{CSMI}$, $p\text{CSMI}$) y sus productos por CtD ($x\text{BSI}$, $p\text{BSI}$, indicadores de resistencia a flexión y torsión), en scans radiales distales de 44 hombres y 112 mujeres normales (N) y 7/107 con fractura de Colles contralateral reciente (Fx), de 45-85 años, apareados por edad (N 64.9 ± 9.5 vs Fx 62.9 ± 10.2 años, $p>0.05$), mediante tomografía computada cuantitativa periférica (pQCT). Los datos no variaron con la edad, y en general las proporciones hombre/mujer y N/Fx decrecieron hacia los rangos bajos de valores en forma gradual y continua. Las gráficas de correlación mecanostática CSMI's vs CtD mostraron similar continuidad de distribución. Estos datos concuerdan con la correlación previamente demostrada entre los BSI's y la fuerza muscular anaeróbica máxima del antebrazo, independiente de sexo, edad y antropometría. Consecuentemente, las aparentes diferencias esqueléticas intersexuales serían meramente alométricas y mecanostáticas; es decir, reflejarían gradaciones distintas de la misma respuesta de estructuras óseas de distinto tamaño a distintos niveles de una misma clase de estimulación: el uso mecánico.

- 216. Análisis no invasivo de la estructura ósea humana: II. Determinación tomográfica (pQCT) del riesgo relativo de fractura de colles.** Ferretti J.L., Capozza R.F., Schneider P., Reiners C., Zanchetta J.R.

CEMFOC (CIUNR-CONICET), Facultad de Medicina, UNR, Rosario; IDIM-FIM, Bs.As., y Klinik für Nuklearmedizin, Universität Würzburg, Würzburg, Alemania.

Aprovechando la gradación continua de valores de indicadores tomográficos de masa trabecular (MT) y de resistencia a compresión, flexión y torsión (RC, RF, RT) observada en scans transversales de radio distal (pQCT) de 52 hombres y 219 mujeres, normales (N, 156) o fracturados de muñeca (F, 115) apareados por edad entre 45 y 85 años, se calcularon las proporciones $F/(F+N)$ (riesgo relativo de fractura, RFR) para 20 rangos sucesivos e iguales de valores de cada variable, y su poder discriminante N/F mediante ROC-análisis a 100 puntos por curva. Las áreas bajo las curvas (ROC) decrecieron según el orden: MT (contenido mineral trabecular), 78.6% > RC (área seccional cortical), 73.3% > RF (momento de inercia axial seccional), 69.1% > RT (momento de inercia polar seccional), 68.8%, con independencia de sexo y edad. Los RFR (de 0 a 1) correlacionaron significativamente ($p < 0.001$) con los valores por rangos de todas las variables, según el mismo orden de ajuste, con SEE especialmente bajos para indicadores de MT y RC. Los datos indican (a) que el componente de compresión sería más importante que los de flexión o torsión para la fractura de Colles, y (b) que el alto poder discriminante de los indicadores de MT y RC permite su empleo en curvas de referencia confiables para estimación no-invasiva de RFR en estudios transversales o longitudinales, con recursos biomecánicamente válidos.

TUMORES V

- 217. Participación Regulatoria de la Proteína Quinasa C (PKC), Fosfolipasa D (PLD) y Acido Fosfatídico (AF) en la Producción de Uroquinasa por Células Tumorales Mamarias Murinas.** JA Aguirre Ghiso, DF Alonso, EF Farias, E Bal de Kier Joffé.

Area Investigación, Instituto de Oncología «AH. Roffo», Universidad de Buenos Aires.

La producción de uroquinasa (uPA) por células tumorales, es un evento crítico del proceso de invasión y metástasis. Previamente demostramos la participación de la PLD y PKC en el control de la expresión del uPA. En este trabajo analizamos y discriminamos mas exhaustivamente el papel regulatorio de la PLD, la PKC y del AF en la producción de uPA por células tumorales de la línea LM3. La producción de uPA se cuantificó en medios condicionados mediante caseinólisis radial y se identificó mediante zimografía o Western blot. Todos los resultados se expresan en UI uPA/mg proteína/24 hs. Estudiamos la modulación por PMA, n-butanol o PMA/n-butanol de la producción de uPA. Además analizamos si el H7 (0.1-1000 uM), AF (1-10⁴ ng/ml) y el propranolol (PRP) (0.1-300 uM) regulaban la producción de uPA por las células LM3. El PMA (0.1-50 nM) revirtió en forma dosis dependiente la inhibición por n-butanol, un inhibidor de la PLD y PKC. Altas concentraciones de PMA (>50 nM) estimularon en menor grado la producción de uPA, la cual fue inhibida en presencia de n-butanol. El H7, un inhibidor de la PKC, inhibió la pro-

ducción de uPA y el AF (hasta 10³ ng/ml) estimuló la misma en forma dosis dependiente. El PRP, un bloqueante del AF, inhibió en forma dosis dependiente la producción de uPA. El pretratamiento con n-butanol (0.3% v/v) durante 24 hs de las células LM3 disminuyó su capacidad de formar colonias metastásicas pulmonares al ser inoculadas i.v. en ratones BALB/c ($p < 0.01$). Estos resultados demuestran el rol regulatorio de la PLD y PKC así como del ácido fosfatídico, en la producción de uPA por células tumorales, con un claro correlato in vivo.

- 218. Receptores a histamina en líneas celulares derivadas de epitelio mamario humano.** C Davio, A Madlovan, B Lemos, C Shayo, A Baldi y E Rivera.

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

Anteriormente caracterizamos receptores H1 y H2 a histamina (Hi) en carcinomas mamarios humanos y experimentales. En este trabajo se estudiaron las líneas celulares derivadas de epitelio mamario humano normal MCF-10A y HBL-100 y la MCF-10T transfectada con H-ras. Mediante estudios de unión se caracterizó un gran número de sitios H1 y de dos sitios tipo H2 ($Kd1 = 1.8 \pm 0.5$ nM; $Kd2 = 20 \pm 4$ nM) en las 3 líneas. Este sitio de mayor afinidad desapareció después de incubación en presencia de GTP γ S, indicando la existencia de una gran fracción del estado activado del receptor. La estimulación con Hi o sus agonistas no fue capaz de producir modificaciones en los niveles de AMPc, aunque en todos los casos la forskolina, el NaF y la PGE₂ produjeron un incremento dosis-dependiente del nucleótido. Por su parte tanto la Hi ($CE_{50} 60 \pm 7$ nM) como los agonistas H1 ($CE_{50} 213 \pm 16$ nM) y los H2 ($CE_{50} 236 \pm 20$ nM) estimularon la producción de inosítoles fosfato. La estimulación con Hi o sus agonistas no indujo modificaciones en la expresión de *c-myc* y *c-fos*. Estos resultados muestran sobre-expresión de receptores a Hi con una asociación particular a los sistemas de transducción de señales aunque aún queda por dilucidar la función de los mismos durante la transformación neoplásica.

- 219. Activación de MAP quinasas inducidas por factores de crecimiento y promotores tumorales en células normales y neoplásicas.** AG Mladovan, A Baldi.

Instituto de Biología y Medicina Experimental. Obligado 2490, 1428 Buenos Aires.

Cuando células en cultivo son tratadas con factores de crecimiento, citoquinas o promotores tumorales, las quinasas activadas por mitógenos (MAPk) son activadas por fosforilación en residuos Tir/Tre específicos. En este trabajo analizamos la activación de MAPk en células de mama humana normales (MCF-10A y HBL100) y transformadas (MCF-7, MDA-453 y MCF-10T) bajo la acción de mitógenos como el EGF, IGF-I e insulina. La activa-

ción de dicha enzima fue analizada por el cambio en su movilidad electroforética como consecuencia de su fosforilación, mediante Western blot. En células MCF-10A, MAPK se activa rápidamente por acción del EGF con una cinética similar a la autofosforilación de su receptor. Asimismo, el EGF activa MAPK en las diversas líneas estudiadas mientras que el IGF-1 o la insulina no modifican su estado fosforilativo. En ciertas células, el incremento de AMPc inhibe la proliferación con la consecuente inactivación de la vía de MAPK. Dos inductores del AMPc, la toxina de cólera (CT) y la prostaglandina E2 (PGE2), inhibieron la proliferación en presencia de EGF en MCF-7 y MDA-453 en un 50% pero no afectaron MCF-10A ni 10T. En ninguno de los casos analizados, DibuAMPc, CT ni PGE2 afectaron la activación de MAPK inducida por EGF sugiriendo que, a diferencia de otros linajes celulares, las kinasas dependientes de AMPc no modularían la vía de las MAPKs en células epiteliales de mama.

220. Rol del Factor de Transformación- β 3 (TGF- β 3) en el crecimiento de adenocarcinomas mamarios murinos. MH Viegas, M Simian, C Lanari, ME Balañá, E Charreau, PV Elizalde.

Instituto de Biología y Medicina Experimental. Buenos Aires.

Se estudió la expresión del TGF- β 3 a nivel mRNA en adenocarcinomas mamarios murinos inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA). Se empleó un ensayo de protección a la digestión por RNasa A. Se detectó el mRNA de TGF- β 3 en cuatro líneas hormono-dependientes (HD), cuatro líneas hormono-independientes (HI) de histología ductal, y cuatro líneas HI de histología lobulillar. Los niveles del mRNA del TGF- β 3 en los tumores HD creciendo en ratones tratados con MPA fueron 2 a 3 veces menores que en los tumores HD obtenidos de ratones sin tratar con MPA, según scanning de autorradiografías provenientes de 3 experimentos idénticos (rango de error: 10-15%). Los tumores HI ductales presentaron niveles de expresión intermedios entre los HD con MPA y HD sin MPA. Las líneas HI lobulillares presentaron niveles variables de expresión de TGF- β 3. Paralelamente, se analizó el efecto del TGF- β 3 en un cultivo primario de uno de los tumores HD por un ensayo de incorporación de 3 H-timidina. Se observó que a una concentración de 1,3 ng/ml, el TGF- β 3 producía una inhibición significativa ($p < 0.001$) del crecimiento de células epiteliales respecto del valor control, y que también revertía, a dicha concentración, el efecto proliferativo del MPA (10 nM). (Un ejemplo de 3 experimentos (valores en cpm): control: 5800 ± 1130 , MPA: 7655 ± 760 , MPA+TGF- β 3: 4717 ± 833 , TGF- β 3: 3928 ± 534). Nuestros resultados permiten postular un rol autocrino negativo del TGF- β 3 en el crecimiento de los tumores HD.

221. Rol de la heregulina (HRG) en la proliferación de adenocarcinomas mamarios inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA) en ratones Balb/c. ME Balañá, R Lupu, C Lanari, M

Simian, MH Viegas, M Goin, EH Charreau, PV Elizalde.

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires.

HRG es el ligando de la familia de receptores relacionados con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Hemos secuenciado parcialmente la HRG de ratón. Muestra una alta homología con los genes de rata (92%) y humano (87%). Mediante ensayos de protección a la RNasa, utilizando como sonda el fragmento de HRG clonado, se detectó el ARNm de HRG en las líneas de carcinomas mamarios inducidos por MPA hormono-dependientes (HD) e independientes (HI) de histología ductal, no encontrándose en las HI de histología lobulillar. En las líneas MPA-D creciendo en ratones tratados con MPA se observaron niveles de HRG entre 2 y 4 veces mayores que en las que crecieron en ratones sin tratar. Las líneas MPA-I de histología ductal presentan niveles de HRG similares a las líneas MPA-D creciendo en ratones tratados con MPA. El agregado de HRG (2ng/ml) a cultivos primarios de células epiteliales de una línea MPA-D de origen ductal que sobreexpresa p185erb2 significativamente inhibe el crecimiento ($p < 0.001$) medida por incorporación de 3 H-timidina [1 ej. de 4 experimentos (en cpm): control: 4187 ± 754 , HRG: 1500 ± 304 , MPA: 6803 ± 660 , HRG + MPA: 1739 ± 556]. Mediante Western blotting observamos presencia de p185erb2 en todas las líneas estudiadas. Postulamos que HRG sería un factor autocrino positivo en la proliferación in vivo de carcinomas mamarios murinos inducidos por MPA.

222. Estudio de las Señales Intracelulares Involucradas en la Regulación de la Extensión sobre Sustrato (spreading) de Células Tumores Mamarias Murinas. JA Aguirre Ghiso, EF Farías, DF Alonso, E Bal de Kier Joffé.

Area Investigación, Instituto de Oncología «AH Roffo», Universidad de Buenos Aires.

El proceso de spreading es realizado por células normales y tumorales durante la adhesión, migración y proliferación. Previamente demostramos que el n-butanol un inhibidor de la fosfolipasa D (PLD) y proteína quinasa C (PKC), inhibió el spreading de células tumorales de las líneas LM3 o F3II. El objetivo de este trabajo fue analizar, en ausencia de SFB, el efecto de distintos agonistas y antagonistas de las vías de señalización de la PLD y PKC, sobre el spreading de células LM3. Para ello se sembraron 7×10^4 células LM3 o F3II por triplicado en placas plásticas de 35 mm. A los 60-100 minutos post-siembra se agregaron las drogas a ensayar y a distintos intervalos se cuantificó el número de células en spreading (250 células/tiempo) en contraste de fase. Los resultados indican % de células en spreading. Se observó que el PMA (5 nM) estimuló el spreading ($p < 0.001$) igual que el SFB (5%) mientras que el n-butanol (0.3% v/v) lo inhibió ($p < 0.001$). Sin embargo la inhibición por n-butanol se revirtió con el PMA ($p < 0.001$). La staurosporina (200 nM) estimuló el

spreading ($p < 0.001$) mientras que la genisteína bloqueó completamente dicho estímulo ($p < 0.01$). El producto de degradación de la PLD, ácido fosfatídico (AF), estimuló el spreading ($p < 0.001$) mientras que el propranolol (100 μ M), que bloquea al AF endógeno, lo inhibió ($p < 0.01$). Estos resultados demuestran que la vía de la PKC-PLD, con un rol preponderante del AF y la participación de enzimas tirosina-quinasa, regularían el spreading de células tumorales.

- 223. Factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGF-I y II) y sus receptores (IGF-R) como mediadores de la proliferación de carcinomas mamarios inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA) en Balb/c.** PV Elizalde, M Simian, S Vanzulli, ME Balanà, MH Viegas, AM Iribarren, M Goín, EH Charreau.

Instituto de Biología y Medicina Experimental. Buenos Aires.

En este trabajo demostramos por hibridación in situ que los mRNAs de IGF-I y II se localizan en las células epiteliales de carcinomas mamarios inducidos por MPA. Por ensayos de estabilización covalente en cultivos de células epiteliales y de fibroblastos de la línea hormono-dependiente (HD)C4 detectamos los IGF-R tipo I y II en ambos tipos celulares. Previamente reportamos que oligodesoxinucleótidos antisense (OA) al mRNA de IGF-R tipo I bloquean el efecto mitogénico de MPA. Ahora demostramos una disminución del 75 % en el número de IGF-R tipo I en las células tratadas con 40mg/ml OA (13.6 ± 1.3 fmol/mg prot) respecto de las controles tratadas con oligodesoxinucleótidos sense (OS) (53.1 ± 3.5). IGF-II no estimuló la proliferación de células epiteliales C4-HD ni potenció el efecto de MPA. OA al mRNA de IGF-II (1mM) bloquearon la proliferación inducida por MPA de C4-HD (medida por incorporación de 3H-timidina) efecto que no revirtió el IGF-II. Los OS no tuvieron efecto (Ej en cpm, control 2196 ± 206 , MPA 9552 ± 1565 , MPA+OA 1908 ± 309 , MPA+OA +IGF-II 2882 ± 1165 , MPA+OS 7875 ± 1317). IGF-II precursor de 14 kDa, fue detectado por Western blot en los controles y en células tratadas con OS. Así i) el efecto de los OA es producido por la disminución en la síntesis de la proteína, ii) el IGF-II sería mediador en la proliferación inducida por MPA por una vía posiblemente intracrina.

- 224. Inhibición por verapamilo (V) del desarrollo metastásico y de la actividad metaloproteasa circulante en ratones portadores del carcinosarcoma F3II.** EF Farías, JA Aguirre Ghiso, V Ladedá, E Bal de Kier Joffé.

Instituto de Oncología AH. Roffo, Universidad de Buenos Aires.

El proceso de invasión y metástasis involucra la proteólisis de las matrices extracelulares por las células tumorales. Entre las enzimas se encuentran las metaloproteasas (MMPs) y la uroquinasa (uPA). El Ca^{++} es un

cofactor de las vías de señalización intracelular que controlan la proliferación y la producción de enzimas. Por lo tanto estudiamos el efecto del V, bloqueante de canales de calcio, sobre el crecimiento local y metastásico, espontáneo o experimental, de células F3II. No se observó toxicidad por el tratamiento oral (V 5 mg/100 ml de agua) durante 45 días en ratones BALB/c. Los grupos estudiados fueron: 1) animales sin V oral e inoculados s.c. o i.v. con células F3II (1A) sin pretratamiento, (1B) pretratadas 24 hs con V 100 μ M, y 2) animales tratados con V oral (5 mg/100 ml de agua) e inoculados s.c. o i.v. con células F3II (2A) sin pretratamiento, (2B) pretratadas con V 24 hs con V 100 μ M. El verapamilo no modificó ni la toma ni la tasa de crecimiento del tumor subcutáneo, pero limitó la invasión local. La incidencia metastásica espontánea fue: 1A= 100%, 1B= 48.75%*, 2A= 66.25%* y 2B= 67%*, * $p < 0.05$. La mediana (rango) de metástasis espontáneas fue: 1A= 6 (2-20), 1B= 1 (0-4)#, 2A= 2 (0-8)#, 2B= 1 (0-3)#, # $p < 0.01$. Las metástasis experimentales mostraron el mismo patrón de inhibición. La actividad MMP circulante disminuyó en los tres grupos tratados. Concluimos que si bien el verapamilo no posee actividad antiproliferativa in vivo, presenta en cambio propiedades antiinvasivas y antimetastásicas evidentes, posiblemente debidas a su capacidad de inhibir la actividad enzimática asociada al tumor o al huésped.

- 225. Alteraciones en la extensión (spreading) sobre fibronectina (FN), colágeno IV (CLIV) y de la distribución intracelular de f-actina y b1-integrina por inhibición de la vía de la PLD-PKC.** JA Aguirre Ghiso, EF Farías, DF Alonso, C Arregui, E Bal de Kier Joffé.

Area Investigación, Instituto de Oncología «AH. Roffo», Universidad de Buenos Aires y Dpto. de Química Biológica, Facultad de Cs. Químicas, UNC.

La adhesión y migración dependen de la interacción entre moléculas de la matriz extracelular (MEC) y las integrinas entre otros receptores celulares. En este trabajo nos propusimos estudiar si la modulación de la vía de la PLD-PKC altera el spreading a componentes de la MEC y la distribución intracelular de f-actina y b1-integrina. Para ello se sembraron 7×10^4 células LM3 en placas plásticas de 35 mm con o sin cubreobjetos y con o sin FN o CLIV. A los 60 min. post-siembra se agregaron las drogas i) Medio control, ii) PMA 10 nM, iii) n-butanol 0.3% v/v y iv) PMA /n-butanol. A los 150 min. se cuantificó el número de células en spreading por microscopía de contraste de fase y los resultados indican el % de células en spreading. Las células LM3 adheridas a los cubreobjetos sin sustratos, se fijaron con PBS/paraformaldehído 4% y tiñeron con phalloidina-TRITC o con el anticuerpo W1B10-FITC para detectar f-actina o $\beta 1$ -integrina, respectivamente. El n-butanol inhibió el spreading sobre FN o CLIV ($p < 0.01$). El PMA no estimuló el spreading sobre los valores del control con FN o CLIV, pero revirtió el efecto inhibitorio del n-butanol, para ambos sustratos. La faloidina-TRITC, que marca

actina polimerizada, mostró una disminución de f-actina en presencia de n-butanol mientras que con PMA o PMA/ n-butanol aumentó. La integrina- $\beta 1$ se distribuyó en puntos de adhesión focal (PAF) y no en placas de adhesión. Se observó que el n-butanol inhibió y el PMA aumentó en forma evidente la presencia de PAF. Estos resultados muestran que la vía de la PLD-PKC regularía el spreading sobre la MEC, así como la organización de componentes del citoesqueleto involucrados en el proceso de spreading.

226. Inhibición por verapamilo (V) de la producción de uroquinasa (uPA) y metaloproteasa (MMP) en células del carcinosarcoma murino F3II. EF Farías, JA Aguirre, V Ladedá, E Bal de Kier Joffé.

Instituto de Oncología AH Roffo. Universidad de Buenos Aires.

El uPA y las MMPs son proteasas claves de los procesos de invasión y metástasis. Previamente demostramos que la vía de la PKC, dependiente de Ca^{++} , regula la producción de uPA y MMPs en células tumorales. Nos proponemos estudiar in vitro el efecto del bloqueante de canales de calcio, verapamilo, sobre la producción de uPA y MMP en células F3II. La actividad uPA y MMP presente en medios condicionados se cuantificó e identificó por caseinólisis radial y zimografía, respectivamente. Monocapas subconfluentes se trataron con V en dosis no citotóxicas (0.01-100 μM) durante 20 hs. Se estudió también el efecto post-tratamiento a las 4 hs y 20 hs luego de la remoción del V. Se evaluó la viabilidad celular para todas las concentraciones y tiempos mediante el test de azul trypan y la actividad metabólica mitocondrial (MTS). No se observó citotoxicidad para ninguna dosis de verapamilo en los tiempos estudiados. El tratamiento con V durante 20 hs produjo una inhibición dosis dependiente de la actividad uPA secretada al medio condicionado (MC) (89% de inhibición con V 100 μM ; IC50 10 μM). Asimismo el V (100 μM) fue capaz de inhibir la estimulación de la producción de uPA inducida por PMA (10 nM), un activador de la PKC (C: 0.76 ± 0.2 , V: $0.34 \pm 0.1^*$, PMA: $1.13 \pm 0.2^*$, PMA/V: $0.4 \pm 0.1^*$ UI uPA, $^*p < 0.01$). El V (100 μM) también mostró un marcado efecto antiproliferativo (C: 72 hs: 15×10^5 células/well, V 72 hs: 3.8×10^5 células/well; $p < 0.01$). Células F3II tratadas con V en las dosis indicadas también mostraron una inhibición de la actividad MMP detectada en el MC. Los ensayos de viabilidad muestran que la inhibición por V de la producción de proteasas no se debe a un efecto citotóxico. Los resultados demuestran que el verapamilo interfiere en la vía de señalización que regula la producción de uPA y MMPs en células tumorales F3II.

226b. Recidivas tumorales: Mayor crecimiento, índice mitótico, y menor índice apoptótico que los tumores primarios del adenocarcinoma mamario murino M3. RP Meiss, LL Colombo.

CEO. Fund. Maissa. Acad. Nac. Med. y Area Investigaciones, Inst. de Oncología AH Roffo (Universidad de Buenos Aires).

Introducción: Mucho se ha escrito sobre recidivas tumorales, la gran mayoría en humanos, con tumores espontáneos, referidos en general a los cambios de diferenciación, agresividad, etc. Poco se ha hecho con recidivas de tumores establecidos, de línea, en modelos animales. Es visión común que las recidivas suelen crecer mejor y tener un aspecto menos necrótico que el tumor primario. **Métodos:** Ratones machos Balb/c fueron operados a los 25 días post trasplante subcutáneo (sc) por trócar de un trozo de 2mm³ del adenocarcinoma mamario poco diferenciado M3. La extirpación se realizó sin dejar ninguna masa tumoral visible. 13 ratones que dieron recidivas se sacrificaron a los 21 días post cirugía. **Resultados:** La masa tumoral alcanzada a los 21 días post-cirugía (14.16 ± 5.54 grs (13)) fue superior a la alcanzada en los 25 días post-trasplante (6.32 ± 2.12 grs (13)) $p < 0.001$. Para conocer si esa mayor velocidad de crecimiento era debida a una mayor proliferación celular o a una menor muerte celular, se contaron las células en mitosis y células apoptóticas por campo de 400X (promedio de 10 campos) sobre secciones histológicas coloreadas con hematoxilina-eosina, tanto en el tumor primario como en la respectiva recidiva de cada ratón. **Resultados:** Se observó un aumento notable de las mitosis: de 5.64 ± 1.18 (13) en los primarios a 11.62 ± 3.13 (13) en las recidivas ($p < 0.001$). Las apoptosis disminuyeron de 3.45 ± 0.65 en los primarios, a 1.63 ± 0.28 (13) en las recidivas. ($p < 0.001$). **Conclusión:** Las recidivas del tumor M3 sc, surgidas de imperceptibles restos tumorales, crecen mucho más rápido que el tumor primario, que fue originado a partir del trasplante de un volumen tumoral considerablemente mayor (visible), y ello se debe, al menos en parte, al mayor % de células en división, y también a una disminución del % de células en apoptosis.

CARDIOVASCULAR III

227. Área geográfica de procedencia como predicción de mayor gravedad miocárdica de la cardiopatía chagásica. S Auger, R Storino, O Caravello, M Jörg.

Hospital Santojanni, Buenos Aires, Fundación INCALP, La Plata. Buenos Aires.

Objetivos: Establecer la relación entre el área geográfica de procedencia y la gravedad de alteración miocárdica alcanzada en la enfermedad de Chagas. **Material y métodos:** Se consideraron 490 pacientes (p) chagásicos atendidos en consultorios externos de Chagas y se realizaron electrocardiograma, Rx de tórax y ecocardiograma a la totalidad. Se tomaron a los p. con miocardiopatía dilatada (134) y se los clasificó de acuerdo al área geográfica de procedencia en dos grandes regiones: A) Región árida: clima desértico de altura y templado continental, precipitaciones escasas, vegetación xerófila; B) Región verde: clima tropical y subtropical, precipitaciones abundantes, vegetación tipo bosque y monte. Se evaluó el predominio de pacientes dilatados procedentes de una y otra región y su edad promedio. **Método estadístico:** Chi cuadrado. **Resulta-**

dos: de un total de 134 p. con miocardiopatía dilatada chagásica, el 45% eran hombres con una edad promedio de 52 años. El 68% de los p. dilatados (91) pertenecían a la región árida con una edad promedio de 42 años. El 32% restante (43 p.) pertenecían a la región verde con una edad promedio de 63 años. Se observó un predominio significativo de pacientes con miocardiopatía procedentes de la región árida y con menor edad ($p < 0.01$). Conclusiones: 1) Los pacientes con miocardiopatía dilatada chagásica proceden en mayor proporción de la región árida. 2) Estos pacientes alcanzan la miocardiopatía dilatada a edad más temprana. 3) Probablemente las condiciones de vida, posibilidades económicas, nutricionales y educativas en ambas regiones desempeñen un rol importante en la evolución de la enfermedad de Chagas.

228. Incidencia de disfunción diastólica en pacientes chagásicos del Grupo I y II. S Auger, M Gorocito, M Fitzmaurice, G Lanosa, N Prieto, R Storino.

Hospital Santojanni, Buenos Aires, Fundación INCALP, La Plata. Buenos Aires.

Objetivos: Determinar la función diastólica en pacientes chagásicos no dilatados, asintomáticos y/o con cambios electrocardiográficos mínimos, a través del ecocardiograma doppler. Métodos: Se incluyeron 50 pacientes (pctes.) chagásicos pertenecientes a los grupos I (serología (+) sin cardiopatía) y II (cardiopatía chagásica sin dilatación) de la clasificación del Consejo Argentino de Enfermedad de Chagas. Se les realizó electrocardiograma (ECG), Rx. de tórax, Holter de 24 hs. y ecocardiograma modo M y 2D para agrupar a los pctes. Con el ecocardiograma doppler se evaluó función diastólica (f.d.) considerando los siguientes parámetros: 1) Valor pico E, 2) Valor pico A, 3) Relación A/E, 4) Periodo de relajación isovolumétrica diastólica, 5) Desaceleración del llenado ventricular rápido. Se tomó como confirmación de disfunción diastólica (d.d.) la existencia de alteraciones en no menos de 2 de los 5 parámetros. Método estadístico: Chi cuadrado. Resultados: De los 50 pctes. estudiados con una edad promedio de 40 años, 58% eran hombres, el 42% pertenecían al grupo I y el 58% restante al grupo II. Del total de pacientes, 29 (58%) presentaron alteraciones de la f.d. ($p < 0.01$); perteneciendo el 41% al grupo I y el 59% al grupo II. Conclusiones: 1) El método permite la detección precoz de disfunción diastólica que precede a las alteraciones sistólicas en la etapa asintomática, donde inclusive otros estudios como el ECG y la Rx de tórax son normales o demuestran pequeñas alteraciones. 2) Se observa una incidencia estadísticamente significativa de d.d. en pacientes chagásicos del grupo I y II; sin embargo la diferencia no es estadísticamente significativa entre un grupo y otro. 3) El seguimiento determinará si estas alteraciones son secuelas de la miocarditis o tienen valor pronóstico evolutivo.

229. Hipertrigliceridemia (HTG) y Transporte Reverso del Colesterol. F Brites, C Bonavita, M Yael, G Castro, R Wikinski.

Lab. de Lípidos y Lipoproteínas, Depto. Bioquímica Clínica, Htal. de Clínicas, FFyB., Universidad de Buenos Aires.

La asociación entre HTG y aterosclerosis podría explicarse, parcialmente, por las alteraciones del transporte reverso del colesterol. En esta vía antiaterogénica cumplen su rol fundamental las HDL. En este trabajo se estudiaron las alteraciones observadas en hombres con bajo colesterol-HDL (c-HDL) y altos triglicéridos plasmáticos (TG) (grupo 1; $n=13$), en comparación con individuos con bajo c-HDL y TG normales (grupo 2; $n=13$) y con controles (grupo 3; $n=13$). En todos los individuos se evaluaron el flujo de colesterol celular, la actividad de la lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT) y la actividad de la proteína transportadora de colesterol esterificado (CETP). La capacidad del suero de los pacientes con bajo c-HDL para promover el flujo de colesterol de células Fu5AH cargadas con colesterol tritinado, fue menor que la de los controles ($p < 0.001$). En los grupos 1 y 2, la actividad de la LCAT fue el 75 y 61 % respectivamente con respecto a los controles. La actividad de la CETP fue mayor en los pacientes con HTG ($p < 0.005$ vs grupos 2 y 3). En este estudio se evidencian disminución del flujo de colesterol y de la actividad de LCAT en sujetos con bajo c-HDL y aumento de la actividad de CETP sólo en el grupo con HTG.

230. VLDL en Hipertrigliceridemia (HTG) con Bajo Colesterol-HDL (c-HDL). F Brites, C Bonavita, A Di Cugno, G Castro, R Wikinski.

Lab. de Lípidos y Lipoproteínas, Depto. Bioquímica Clínica, Htal. de Clínicas, FFyB., Universidad de Buenos Aires.

Está ampliamente aceptado que la LDL tiene capacidad aterogénica y que la HDL cumple un papel protector, pero aún se encuentra en discusión el rol de las lipoproteínas ricas en triglicéridos en la patogénesis de la aterosclerosis. Nuestro objetivo fue estudiar la composición de la VLDL de pacientes con HTG y c-HDL disminuido (Grupo 1, $n=12$) o normal (Grupo 2, $n=7$) y de normotrigliceridémicos con c-HDL disminuido (Grupo 3, $n=12$) o normal (Grupo 4, controles, $n=17$). La VLDL del grupo 1 con respecto a los controles, fue más rica en triglicéridos (TG) (61.1 ± 3.7 vs 48.2 ± 5.6 %, Media $\pm$ DE, $p < 0.0001$) y de mayor tamaño (2.67 ± 0.58 vs 1.55 ± 0.34 , $p < 0.001$), evaluado por el cociente entre los componentes del centro y de la superficie de la partícula. Estas alteraciones fueron comunes a los grupos 1, 2 (TG = 56.4 ± 4.9 %; Cociente = 2.16 ± 0.39) y 3 (TG = 55.8 ± 5.1 %; Cociente = 1.96 ± 0.34). En los pacientes con HTG se observaron además niveles elevados de apo C-III y E asociadas a apo B (LpB). La LpC-III:B correlacionó positivamente con la proporción de triglicéridos de VLDL ($r = 0.42$, $p < 0.005$, $n = 48$). La variación de todas estas alteraciones entre los grupos refleja la asociación entre diferentes tipos de VLDL y la concentración de c-HDL.

- 231. Efectos de la preincubación con insulina sobre la respuesta contráctil a arginina vasopresina y a endotelina 1 en aorta de rata.** A Rebolledo, V Milesi, G Rinaldi, AO Grassi de Gende.

Cátedras de Anatomía y Fisiología y de Fisiología Humana, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, Buenos Aires.

Previamente demostramos que la preincubación de anillos de aorta de rata con insulina (Ins) produce un aumento de la fuerza desarrollada (F) y de la velocidad de relajación (VR) en contracciones inducidas por angiotensina II. En este trabajo estudiamos los efectos de la Ins sobre las respuestas a arginina vasopresina (AVP) y a endotelina 1 (ET1). Anillos de aorta de rata (n=18) estimulados con AVP 1µM antes y después de incubar 60 min con Ins 40mU/ml presentaron menor taquifilaxia ($DF = -31,4 \pm 2,0 \text{ mg/mm}^2$) que los estimulados sin incubar con Ins ($DF = -39,2 \pm 2,3 \text{ mg/mm}^2$ $p < 0,05$). La VR no se modificó significativamente por el tratamiento con la hormona. La F y la VR de las contracciones inducidas por ET1 0,01mM (n=20) no fueron afectadas por Ins. El bloqueo de la producción de óxido nítrico (NO) por L-NAME 0,1mM (n=14) potenció las contracciones por ET1 en forma similar para los grupos con (126 ± 11 vs $156 \pm 8 \text{ mg/mm}^2$) o sin (114 ± 6 vs $144 \pm 6 \text{ mg/mm}^2$) pretratamiento con Ins. Se concluye que en aorta de rata la preincubación con Ins potencia las contracciones por AVP, y que en nuestras condiciones experimentales no hay manifestaciones mecánicas en las contracciones por ET1 de un aumento de la expresión de los receptores ETA inducida por Ins, como se ha demostrado en células de aorta de rata en cultivo.

- 232. Efecto de mecanismos extrusores y/o secuestradores de calcio sobre la relajación inducida por activación de la Na^+/K^+ -ATPasa en aorta de rata.** F Ayala Paredes, GJ Rinaldi.

Cátedra de Fisiología Humana, Fac. de Ciencias Exactas, UNLP, Buenos Aires.

Introducción: La activación de la Na^+/K^+ -ATPasa relaja el músculo liso arterial contraído por noradrenalina (NA) por hiperpolarización de la membrana con menor entrada de calcio. **Métodos:** para estudiar el rol de mecanismos secuestradores y/o extrusores de calcio en esta relajación, se incubaron 4 grupos de anillos de aorta torácica a 2 g de tensión de reposo por 1 hora. Luego de 20 min. en solución sin K ($\text{K}=0$) se contrajeron con NA 1 µM. En dos grupos se agregó Rianodina 1 µM (RI) o Vanadato 100 µM (VAN) para inhibir retículo sarcoplásmico (RS) y Ca^{++} -ATPasa de membrana respectivamente. Estabilizada la contracción se agregó KCl 5 mM en presencia de Na (Control, RI y VAN) o en ausencia de Na (reemplazo con metilglucamina, grupo Na=0) para inhibir el intercambiador $\text{Na}-\text{Ca}^{++}$. **Resultados:** La contracción en $\text{K}=0+\text{NA}$ (media ± 1 ESM, mgF/mgP) fue: Control= 1012 ± 100 (N=6), RI= 878 ± 154 (N=6), VAN= 846 ± 235 (N=6), Na=0: 759 ± 475 (N=8) (NS, ANOVA + test de Tukey). La relajación por $\text{K}=5$ µM fue:

control 41 ± 4 %, RI 62 ± 3 %, VAN 38 ± 6 %, Na=0 82 ± 5 % ($P < 0,05$ para RI y Na=0 vs. control, ANOVA + test de Tukey). **Conclusiones:** la Ca^{++} -ATPasa de membrana no modifica la relajación por Na^+/K^+ -ATPasa en aorta de rata, la cual es aumentada en forma paradójica por la inhibición del RS y del intercambiador $\text{Na}-\text{Ca}$.

- 233. Un bloqueante del intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Na^+ independiente en miocardio.** BV Alvarez, IL Ennis, MCC de Hurtado, HE Cingolani.

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas de La Plata, Buenos Aires.

En la regulación del pH intracelular miocárdico (pHi) intervienen dos mecanismos alcalinizantes Na^+ dependientes, el intercambiador Na^+/H^+ (NHE) y el cotransporte $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (Cot), los que se activan durante la acidosis intracelular. Existe sólo un mecanismo acidificante, el $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Na^+ independiente (AE). Este mecanismo, activable por sobrecarga alcalina, extruye HCO_3^- de la célula en intercambio por Cl^- extracelular. La expulsión de HCO_3^- se realiza mientras $[\text{Cl}]_o/[\text{Cl}]_i > [\text{HCO}_3]_o/[\text{HCO}_3]_i$. La remoción de Cl^- del extracelular invierte el intercambio y el miocardio se alcaliniza. Bloqueantes como SITS o DIDS, bloquean tanto al Cot como al AE, lo que dificulta la disección de los dos mecanismos luego de intervenciones farmacológicas que activan mas de uno de ellos. El IRIS de Francia ha sintetizado un bloqueante específico del AE (S20787), el cual nos fue provisto para su evaluación en miocardio. Los experimentos se realizaron en mdsulos papilares de gato, cargados con BCECF/AM, perfundidos con buffer $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$. El pHi fue $7,15 \pm 0,02$ y $7,16 \pm 0,04$ (n=4, NS) antes y después, respectivamente, de la exposición a S20787 (20 min, 0,5 µM). La remoción de Cl^- subió el pHi en $0,19 \pm 0,03$ (n=14) por reversión del AE. S20787 redujo este aumento de pHi ($0,06 \pm 0,03$, n=4, $P < 0,05$). Durante la sobrecarga alcalina inducida por exposición a trimetilamina, la velocidad de recuperación del pHi fue de $0,016 \pm 0,004$ unidades de pH/min en ausencia de S20787 y de sólo $0,004 \pm 0,001$ (n=3, $P < 0,05$) en presencia de S20787 (1 µM). Se concluye que este bloqueante específico del AE es efectivo en miocardio donde bloquea aproximadamente 70-75% de la actividad del AE. Son necesarios experimentos adicionales a los efectos de dilucidar si el compuesto es capaz de un bloqueo total del AE.

- 234. Sobre un cotransporte $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ electrogénico en miocardio.** EA Aiello, HE Cingolani.

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, Buenos Aires.

Dentro de los mecanismos que regulan el pH intracelular (pHi) miocárdico se ha descripto un cotransporte $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ con función similar al del intercambiador Na^+/H^+ . Este mecanismo segdn la descripción original sería electroneutro al introducir un ión Na^+ acoplado a un HCO_3^- . Estudios posteriores de nuestro laboratorio (J. Mol. Cell. Cardiol. 27: 231-242, 1995) sugirieron en preparados multicelulares que la estequiometría

NEUROCIENCIAS III

metría de este era de un ión Na^+ acoplado a dos iones HCO_3^- , produciendo de este modo una corriente outward. Se realizaron experimentos en miocitos cardíacos aislados de gato con la técnica de Patch Clamp, configuración Patch Perforado con Nistatina, configuración que preserva el interior celular. El cambio de la solución que baña el miocito de HEPES (pHo 7.4) a HEPES + HCO_3^- (pHo 7.4) indujo una hiperpolarización del Potencial de membrana (E_m) de 2.8 ± 1.2 mV y se observó un acortamiento en la duración del Potencial de acción (AP) del 19.3 ± 4.6 y 11.9 ± 3.8 % ($n=7$, $p<0.05$) medidos al 50 (APD50) y 90 % (APD90) de la repolarización, respectivamente. Ambos efectos fueron inhibidos por el bloqueante aniónico SITS (0.1 mM). En presencia de HCO_3^- se observó un incremento en la corriente outward de estado estacionario provocada por rampas de voltaje que van entre -130 y +30 mV durante 8 segundos. Esta corriente aumentó a medida que creció la fuerza impulsora para inducir el influjo de HCO_3^- a través del cotransportador. Estos resultados nos permiten concluir definitivamente que el cotransporte $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ es electrogénico y contribuye a determinar el E_m y AP miocárdicos.

- 235. Normalización de la hiperactividad del intercambiador Na^+/H^+ y regresión de la hipertrofia cardíaca por inhibición de la enzima convertidora.** IL Ennis, BV Alvarez, MCC de Hurtado, HE Cingolani.

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas de La Plata. Buenos Aires.

Numerosas evidencias sugieren un rol crítico del sistema renina-angiotensina tisular en el control del crecimiento cardíaco. Recientemente demostramos la hiperactividad del intercambiador Na^+/H^+ (NHE) en el miocardio hipertrófico (Circ Res $77 \pm 1192, 1995$). Nuestro objetivo fue determinar el efecto de enalapril (ENA) sobre la hipertrofia cardíaca (HC) y su marcador específico, el iNH. Ratas hipertensas espontáneas (SHR) y normotensas (WKY) de 3 meses recibieron ENA (25 mg/Kg/día) durante 5 semanas. Los controles fueron SHR y WKY (igual sexo y edad) sin tratamiento. La HC se midió por el cociente entre el espesor de la pared libre de VI y peso corporal (EVI/PC, en $\mu\text{m-g}$) y el pH miocárdico (pHi) por epifluorescencia (BCECF/AM). ENA disminuyó la presión sistólica de 190 ± 3 a 141 ± 5 mmHg ($n=5$, $P<0.05$) en SHR. En WKY no se detectó efecto hipotensor de ENA (116 ± 5 vs 109 ± 5 mmHg, $n=5$, NS). EVI/PC fue 1.1 ± 0.05 en SHR ($n=14$, $P<0.05$) respecto de SHR+ENA (0.89 ± 0.05 , $n=5$) y de WKY (0.91 ± 0.04 , $n=15$). La regresión de HC por ENA se acompañó de la normalización de la actividad del NHE, siendo el pHi (en buffer HEPES) 7.27 ± 0.02 en SHR; 7.16 ± 0.03 en WKY y 7.16 ± 0.01 en SHR+ENA. Los resultados obtenidos demuestran la normalización de la actividad del NHE por ENA y sugieren un rol protagónico del sistema renina-angiotensina en la regulación de éste marcador específico de HC.

- 236. Ocitocina estimula la secreción de LHRH a través del óxido nítrico.** G Canteros, V Rettori, SM McCann*.

*CEFYBO-CONICET. Buenos Aires Argentina
Pennington Biomedical Research Center Baton Rouge Louisiana USA.

Recientemente hemos demostrado que en la estimulación de la secreción de LHRH por norepinefrina (NE) interviene el óxido nítrico (NO), a su vez NE activa la producción de NO. Por otra parte hemos visto que la ocitocina (OT) 10^{-9} a 10^{-5} M estimula la secreción de LHRH. Por lo cual estudiamos si en la estimulación de LHRH por OT intervienen las vías de NE y NO. Se incubaron hipotálamos medios basales (HMB) de ratas machos en presencia de OT (10^{-7} M), prazosin (PZ, 10^{-4} M) antagonista α_1 adrenérgico y L-NMMA (300 μM) N-monometil-arginina, inhibidor competitivo de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Los resultados fueron expresados en pg de LHRH/HMB x 30 min (medidos por RIA). Control (8): 3.2 ± 0.22 ; OT (5): 8.46 ± 0.5 , OT+L-NMMA (5): 4.44 ± 0.41 ; OT+Pz (5): 4.53 ± 0.65 ; (OT vs todos los grupos $p<0.001$), Pz y L-NMMA per se no tuvieron efecto. Por otra parte la OT estimuló la actividad de NOS medida por el método de la ^{14}C -arginina. Esto demuestra que la OT actúa a través de la vía noradrenérgica que a su vez utiliza la vía de NO para aumentar la secreción de LHRH.

- 237. Study on the control of growth hormone secretion in early postnatal development by means of rat pituitary cell cultures.** VI Goudochnikov*, TV Mamayeva, VP Fedotov.

*Laboratory for Biological Research of Hormonal Compounds, Institute of Experimental Endocrinology, National Endocrinological Research Center, RAMS, Moscow, Russia. *-Pesquisador Visitante - CNPq, UFSM - RS - Brasil.*

Employing primary monolayers, we have shown that corticosteroids (dexamethasone, corticosterone, aldosterone) and progesterone (1 μM) stimulated growth hormone (GH) release from both neonatal and adult rat pituitary cells, while thyroliberin (10 ng/ml), bromocryptine and melatonin (100 nM) were capable to change GH secretion only in the cultures of neonatal cells ($N = 5-12$; $P < 0.05$). Dexamethasone (10 nM) potentiated stimulatory action of norepinephrine (100 nM) on somatotrophs of rat pups. Insulin (1 μM) stimulated GH secretion by neonatal rat pituitary cells more than 3-fold and, on the contrary, it caused approx. 50% inhibition of GH release from adult rat cells. When added alone, and especially in combination with L-triiodothyronine (20 nM), dexamethasone had the permissive action on the inhibitory influence of insulin on GH secretion by rat pup cells. Calcium ionophore A23187 (5 μM) and chelator EGTA (2 μM) caused simi-

lar changes of GH release from rat pituitary cells of different age groups. In contrast, distinct age-related peculiarities of stimulatory influence of dibutyryl-derivatives of cyclic AMP and cyclic GMP (2.5 μ M) on GH release were clearly demonstrated.

238. Participación de la serotonina (5-HT) en la liberación de prolactina (PRL) inducida por inmovilización y estimulación glutamatérgica. C Bregonzio, AO Donoso.

Laboratorio de Investigaciones Cerebrales-CONICET y Facultad de C. Médicas, UNC, Mendoza.

En un trabajo anterior se mostró que la liberación de PRL inducida por el estrés de inmovilización es mediada por el aminoácido excitatorio ácido glutámico. Con el objeto de analizar si esta vía está primariamente involucrada o si otro(s) transmisor(es) participan en ese mecanismo, ratas hembras Sprague-Dawley en estadio de estro fueron expuestas al estrés durante 15 min o inyectadas con el agonista N-metil-D-aspartico (NMDA; 60 mg/kg sc). Previamente (-30 min) recibieron el antagonista selectivo 5-HT_{2A}/5-HT_{2C} ritanserina (5 mg/kg sc) o el antagonista mixto 5-HT_{1A}/5-HT₂ metiotepina (2.5 mg/kg ip). Los animales fueron sacrificados por decapitación al finalizar el período de estrés o 35 min después de NMDA. Se observó que tanto el estrés como el NMDA incrementaron significativamente los niveles séricos de PRL (salina: 6.5 ± 1.9 ng/PRL ml suero; estrés: 167.5 ± 19.6 ; NMDA: 107 ± 3) ($P < 0.01$). Por su parte, la ritanserina previno el aumento de PRL sérica post-estrés ($P < 0.05$) y post-NMDA ($P < 0.01$) respecto a los controles, no modificando por sí misma la secreción hormonal (estrés 240.6 ± 21.7 ; ritanserina+estrés: 98.8 ± 20.3 ; ritanserina+NMDA: 32.4 ± 8.4). La metiotepina, en cambio, fué incapaz de bloquear las respuestas (estrés + metiotepina: 121.3 ± 21.3) y por sí misma aumentó la liberación de PRL (134.2 ± 36.4 ; $P < 0.001$ vs control). Estos resultados indican que una vía 5-HT participa en la estimulación de la PRL inducida por el estrés o NMDA; de acuerdo a los efectos de los antagonistas, los receptores involucrados serían del subtipo 5-HT_{2A}/5-HT_{2C}.

239. Alteraciones de los receptores glutamatérgicos NMDA por hipoxia neonatal. R Otoy, AM Seltzer, AO Donoso.

Laboratorio de Investigaciones Cerebrales-CRICYT, CONICET y Fac. de C. Médicas, UNC, Mendoza.

Se ha demostrado que el ácido glutámico (glu) participa en el desarrollo de las lesiones cerebrales producidas por la hipoxia(HI). En el presente trabajo se analizan los receptores NMDA (ácido N-metil-D-aspartico) en ratas machos de 4 días de edad sometidas a HI(O₂ 6.5 %-N₂ 93.5%;70 min). Los controles (C) se expusieron al aire ambiental. Los animales fueron sacrificados por decapitación; se obtuvieron cortes de cerebro que se incubaron con ¹²⁵I-MK-801, un ligando para el canal iónico del receptor, a las concentraciones de 0.8 nM (saturación) y 0.4nM (cerca al Kd), en presencia ó no de Glu 100 μ M y glicina 5 μ M (Gli), que modulan la apertura

del canal iónico. Se examinó la densidad de los receptores mediante densitometría con video-imagen. Se observó que 4 h después de HI no hubo modificaciones en la densidad óptica (D.O.) a [0.8 nM] en el hipotálamo (Ht), amígdala (Amig), corteza cerebral (CC), hipocampo (Hpc), cuerpo geniculado (CG) o tálamo (Tal). En cambio, a [0.4 nM] se halló una disminución importante de la D.O. en Ht ($P < 0.001$), Amig ($P < 0.01$), CC ($P < 0.05$) e Hpc ($P < 0.01$). En el día postnatal 40 no hubo cambios a [0.8 nM] pero a [0.4 nM] disminuyó la D.O. en Hpc ($P < 0.05$) y CC ($P < 0.05$). En presencia de Glu/Gli no se observó ningún cambio o sólo un ligero aumento en la D.O. en las ratas HI (Hpc, CC y Tal; $P < 0.01$) mientras que aumentaron en los C. En el Ht, Amig y CP no hubo diferencias entre HI y C. Se concluye que la HI neonatal modifica los receptores NMDA, posiblemente su afinidad y función, tanto en la etapa aguda como en la crónica.

240. Dexametasona (DEX) aumenta la inmunoreactividad del receptor p75 para neurotrofinas en la médula espinal (ME) lesionada. SL González, MC González-Deniselle, A Lima, AF De Nicola

IBYME-Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Los glucocorticoides regulan la expresión y función de neurotrofinas (NT) y sus receptores en el SNC. Las NT poseen múltiples efectos neuroprotectores sobre la ME lesio-nada. En este estudio demostramos los efectos de la transección (TRX) y administración de DEX sobre la inmunoreactividad (IR) del receptor para NT de baja afinidad p75 en motoneuronas de ME. Cortes de ME de ratas Sham, Sham+DEX, TRX o TRX+DEX (3 x 5mg/kg post-lesión) se incubaron con Mab192, anticuerpo que reconoce el receptor p75. El análisis por imágenes demostró que: (1) escasas motoneuronas en ME intactas presentaban IR-p75; (2) TRX aumentó 20 veces el número de motoneuronas IR en Lámina IX del asta anterior (Sham: 0.290 ± 0.172 , TRX: 6.319 ± 0.796 , $p < 0.05$); (3) DEX administrada a ratas TRX no causó cambios en el número de motoneuronas IR/Lámina IX; (4) DEX aumentó el número de procesos IR/célula en las motoneuronas de ratas TRX (TRX: 1.16 ± 0.32 , TRX+DEX: 2.69 ± 0.29 , $p < 0.03$ vs. TRX). Conclusiones: la lesión per se aumenta la expresión en pericarion de p75, en tanto que DEX expande la IR hacia los procesos de las motoneuronas. Dado que se ha descrito que este evento ocurre en paralelo con el crecimiento axonal, se sugiere que DEX ejercería un efecto neurotrófico y protector sobre la ME lesionada.

241. Efectos: del tiempo de diabetes y de la adrenalectomía (ADX) sobre las motoneuronas (MN) del núcleo bulbo cavernoso de la médula espinal (SNB). DM Gelman, MC Vega, H Coirini.

Lab Neurobiología, IBYME y Depto. Bioquímica Humana, Facultad de Medicina Universidad de Buenos Aires.

El SNB está constituido por MN sexualmente dimórficas que inervan músculos perineales. Previamente describimos una reducción en el tamaño del SNB en ratas macho diabetizadas con estreptozotocina (STZ). En el presente trabajo evaluamos el tiempo necesario luego del tratamiento con STZ para evidenciar cambios morfológicos en las MN; y la influencia que los niveles de glucocorticoides circulantes ejercen sobre estas. Ratas macho adultas (45d) fueron divididos en 5 grupos ($n=6$ c/u) e inyectados con vehículo o STZ (60 mg/kg) a $t=0$; 1; 2 ó 3 semanas y sacrificados a $t=4$ semanas. En otro experimento 4 grupos de animales ($n=8$ c/u) controles, sham o ADX y diabéticos sham o ADX fueron sacrificados a $t=4$ semanas. Las MN fueron evidenciadas mediante tinción de Nissl. El número y tamaño de las MN se determinó mediante un equipo de análisis de imágenes. Los histogramas de distribución, de número vs. tamaño de MN mostraron un corrimiento significativo hacia izquierda luego de $t=2$ semanas $p<0.001$ (Kolmogorov-Smirnov). La ADX per se produjo una reducción en el tamaño de las MN de núcleo en ambos grupos experimentales observándose una reducción en el número de MN $> 2000\mu^2$ (12-75% en controles y 15-27% en diabéticos) Conclusiones: Dos semanas de diabetes son suficientes para provocar cambios morfológicos en las MN del SNB, las cuales parecen estar parcialmente protegidas por acción de niveles normales de glucocorticoides, sin embargo otros factores dependientes de la presencia de insulina ejercerían una mayor influencia sobre su morfología.

242. Influencia del N.Subtalámico sobre la actividad neuronal unitaria de la sustancia negra reticulada en rats 60HDA. Tseng K.Y., Riquelme L.A., Murer M.G. y Pazo J.H.

Lab. de Neurofisiología, Fac. de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Se ha demostrado recientemente que la lesión del núcleo subtalámico (NSL) produce un efecto antiparkinsoniano en monos MPTP. Nuestros objetivos fueron: (1) evaluar la actividad espontánea y (2) la inducida por microinyección de apomorfina (APO) intraestriatal ipsilateral. Se registró la actividad unitaria en neuronas de la sustancia negra reticulada (SNr) en ratas: (A) normales, (B) 60HDA y (C) 60HDA+lesión NSL. Los parámetros analizados fueron: frecuencia promedio (FP), intervalo interespigas con su coeficiente de variación (CV), y el autocorrelograma. En (1) los patrones de descarga para (A) $n=33$, (B) $n=26$ y (C) $n=19$, fueron: regular (54%, 11%, 15%), irregular con bajo CV (33%, 23%, 47%), irregular con alto CV (12%, 26%, 21%), salvas (0%, 38%, 15%) [X^2 A vs B $p<0.001$ y B vs C $p<0.05$]. El CV también muestra diferencia significativa, debido a la actividad en salvas, [A: $.22\pm.02$; B: $.50\pm.09$ y C: $.33\pm.05$; $F(3,93)=6.19$, $p<0.001$]; no así la FP. En (2) se obtuvo respuesta en un 62.5% (A $n=16$), 87.7% (B $n=21$) y 64.7% (C $n=17$) con diferencia significativa entre (A)vs(B) [$X^2=4.83$, $df=1$, $p<0.05$] y (B)vs(C) [$X^2=6.11$, $df=1$, $p<0.02$]. La incidencia de respuesta excitatoria e inhibitoria fue similar entre los grupos. El CV del grupo (B) dentro del

subtipo con respuesta inhibitoria resultó significativo [$F_{(1,58)}=27.77$, $p<0.0001$]. La latencia de la respuesta fue mayor en (C) [$F_{(3,35)}=3.81$, $p<0.02$]. Conclusión: La lesión con 60HDA produce aparición de un patrón en salvas, con aumento de las unidades que responden a la APO; revirtiéndose en forma significativa con la lesión del NSL.

243. Posible acción analgésica del estriado de la rata. JH Pazo, J Belforte, AC Bareló.

Facultad de Medicina, Depto. Fisiología, Lab. Neurofisiología y Cátedra de Fisiología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires.

Clásicamente a los ganglios basales se le atribuyeron funciones motoras, pero actualmente, también funciones cognitivas, autonómicas y analgésicas. A fin de estudiar estas últimas, en ratas anestesiadas con Uretano (1,2g/kg, i.p), se les estimuló eléctrica y farmacológicamente el Estriado previo a la estimulación nociceptiva de los incisivos inferiores. También se registró la actividad de las neuronas del n. sensorial del V par que responden al dolor dentario. La activación eléctrica por trenes de pulsos, precediendo en 20 a 140 mseg al estímulo dentario, de las parte ventromediales del Estriado rostral y o la aplicación de glutamato (327 mM/1 μ l) reducen las respuestas del m. Digástrico a la estimulación nociceptiva dentaria (216.8 ± 21.8 a 30.7 ± 10.9 μ V, $P<0.05$, $n=30$, Anova p/medidas repetidas). Esas mismas zonas inhiben la actividad espontánea y evocada por la estimulación dentaria de las neuronas del n. caudal del V par (17 neuronas de un total de 20). La activación de otras zonas del núcleo no modifican las respuestas. De lo anterior concluimos que la región ventromedial del Estriado rostral estaría involucrado en los mecanismos de la analgesia endógena.

244. La edad afecta la excreción urinaria de Imao en ratas estresadas. MC Gil, I Armando, J Aguirre, M Barontini.

Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE), Buenos Aires.

La orina de rata contiene un compuesto/s capaz de inhibir la actividad de la enzima monoamino-oxidasa (MAO) in vitro. Se ha demostrado que su excreción (IMAO) se encuentra aumentada en ratas sometidas a un estímulo estresante. En trabajos previos demostramos que el aislamiento de los animales en jaulas metabólicas produce perturbaciones conductuales dependientes de la edad de los mismos. Este estudio evalúa la excreción urinaria de IMAO en ratas de distintas edades sometidas a 7 días de aislamiento en jaula metabólica y su correlato con la excreción urinaria de catecolaminas. Se estudiaron ratas Wistar macho de 3 ($n=6$) y 12 ($n=6$) meses. Se recolectó orina de 24 hs durante 7 días para determinación de Adrenalina (A), Noradrenalina (NA) y Dihidroxifenilglicol (DHPG) por HPLC con detección electroquímica, como así también la actividad IMAO de extractos purificados de orina sobre la enzima de hígado de rata utilizando como sustrato 14 C-tiramina (con-

centración final 83 mM). En el día 1 la A y NA urinarias fueron similares en ambos grupos. La excreción de IMAO fue mayor ($p < 0.01$) durante todo el estudio en las ratas de 3m que en las de 12m (día 1: 55 ± 4 vs 25 ± 5 %/10 mg creat.). En las ratas de 3m la actividad IMAO ($p < 0.01$) y la excreción de A ($p < 0.05$) fueron mayores mientras que la excreción de NA fue menor ($p < 0.03$) en los días 5 a 7 que en los días 1 a 4. En las ratas de 12m la actividad IMAO fue similar en los días 1 a 6 pero aumentó en el día 7 ($p < 0.02$), la excreción de A mostró una tendencia a aumentar en los días 6 y 7 en tanto que la de NA no varió significativamente. Tanto en las ratas de 3 como en las de 12m la excreción de DHPG no mostró diferencias significativas a lo largo del estudio. Estos resultados muestran que en este modelo de estrés además de las perturbaciones conductuales ya descriptas se producen modificaciones en la excreción de IMAO y catecolaminas que son dependientes de la edad.

FARMACOLOGIA

- 245. Estudio fitoquímico y farmacológico de *Larrea divaricata* Cav.** C Anesini, G *Ferraro, A M Genaro, G Cremaschi, L Sterin Borda, E Borda.

*Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología (UBA), CEFYBO-CONICET y * Cátedra de Farmacognosia, Facultad de Farmacia y Bioquímica (Universidad de Buenos Aires).*

En estudios previos demostramos que un extracto acuoso obtenido a partir de las hojas de esta planta presentaba actividad inhibitoria sobre la proliferación de células tumorales (linfoma murino BW 5147); así como actividad antitumoral "in vivo" sobre un modelo de carcinoma mamario. Con el objetivo de aislar e identificar los principios activos del extracto acuoso (A), se realizó a partir del mismo un fraccionamiento líquido/líquido con solventes de polaridad creciente como: éter (E), cloruro de metileno (CM), acetato de etilo (AE) y butanol (B). La actividad de distintas concentraciones de los extractos obtenidos, sobre la proliferación de las células BW 5147, fue analizada y evaluada a través de la captación de timidina tritiada. Los resultados corresponden a dos experimentos realizados por triplicado e indican que, el extracto CM presenta la mayor potencia inhibitoria, con respecto al extracto acuoso, mientras que la menor potencia se obtuvo con el extracto B: CI_{50} (A): $200 \mu\text{g/ml} \pm 6$; CI_{50} (CM): $20 \mu\text{g/ml}$; CI_{50} (AE): $70 \text{ mg/ml} \pm 4$; CI_{50} (B): $350 \text{ mg/ml} \pm 8$, (E) presentó actividad estimuladora. El ácido nor-dihidroguaiarético (10^{-5}M) inhibió los efectos estimuladores y potenció los inhibidores de estos extractos. Concluimos que en esta especie vegetal existen por lo menos dos principios activos, uno inhibitorio y otro estimulador, en cuyo mecanismo de acción estarían involucrados los caminos metabólicos del ácido araquidónico.

- 246. Participación de la óxido nítrico sintetasa (NOS) en el mecanismo de acción de mediadores del proceso inflamatorio en glándula**

submaxilar (SM) de rata. AM Genaro, ME Sales, C Pérez Leirós, G Stranieri, L Sterin Borda, ES Borda.

CEFYO-CONICET. Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología. UBA. Buenos Aires.

Se ha demostrado que el NO participa en la inflamación como bactericida, vasodilatador y regulador de la respuesta inmune. Investigamos la participación del NO en el mecanismo de acción de bradikina (Bk) y prostaglandina E₂ (PGE₂) conocidos mediadores inflamatorios, en glándula SM de rata. Así medimos la actividad de NOS por formación de citrulina a partir de L-(U¹⁴C)-arginina y los niveles de GMPc por RIA. Ambas sustancias aumentaron significativamente la actividad de NOS (pmol/g) (n=6): Basal: 230 ± 40 ; Bk (10^{-5}M): 430 ± 20 ; PGE₂ (10^{-6}M): 490 ± 50 . Observamos incremento en los niveles de GMPc (pmol/g) (n=5): Basal: 23.8 ± 3.4 ; Bk: 61.9 ± 5.6 ; PGE₂: 34.5 ± 4.2 . Por otra parte el efecto de Bk fue inhibido por BPB (10^{-5}M) bloqueante de la enzima PLA₂ y por ASA (10^{-5}M). También evaluamos la liberación de PGE₂ (pg/mg) (n=5) inducida por Bk: Basal: 3.61 ± 0.81 ; Bk (10^{-5}M): 8.23 ± 0.94 , efecto mimetizado por nitroprusiato de sodio (10^{-5}M) generador de NO y antagonizado por L-NMMA (10^{-4}M). Concluimos que la Bk por producción de NO ejercería un efecto vasodilatador en glándula SM. El NO liberado activaría a la ciclooxigenasa aumentando la liberación de PGE₂, la que regularía positivamente a la NOS. Bk y PGE₂ ejercerían conjuntamente una acción vasodilatadora e inmunomoduladora en la inflamación bucal.

- 247. Regulación de la actividad de óxido nítrico sintetasa (NOS) en glándulas submaxilar (SM) y sublingual (SL).** C Pérez Leirós, AM Genaro, ME Sales, F Rosignoli, ES Borda.

Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología, UBA. CEFYO-CONICET. Buenos Aires.

La secreción de las glándulas salivales está controlada por el sistema nervioso central. Existen diferencias entre las glándulas SM y SL en la innervación parasimpática, la composición acinar y la contribución relativa al flujo total de saliva. Estudiamos la participación de la NOS en la activación colinérgica de ambas glándulas. Se midieron la actividad de NOS usando como sustrato L-(U¹⁴C)-arginina (pmol/g) y los niveles de GMPc (pmol/g) por RIA en presencia de carbachol (C). En glándula SM el efecto de C fue bifásico: actividad de NOS (n=4) basal: 246 ± 20 ; C (10^{-7}M): 424 ± 31 ; C (10^{-5}M): 158 ± 17 . Un efecto similar se observó en los niveles de GMPc (n=4): basal: 23.8 ± 1.9 ; C (10^{-7}M): 38.7 ± 2.9 ; C (10^{-5}M): 18.5 ± 1.5 . Además el C en forma dependiente de la concentración estimuló la acumulación de fosfatos de inositol (PI) (UA/mg) (n=4): basal: 46.8 ± 3.4 ; C (10^{-5}M): 418 ± 45 . Staurosporina (St) (10^{-9}M) inhibió los efectos de C (10^{-5}M) sobre NOS y GMPc e incrementó los basales sugiriendo una regulación negativa por la enzima PKC. En glándula SL, el C estimuló en todas las concentraciones empleadas la actividad de NOS: (Emax) (n=4): basal: 364 ± 27 ; C (10^{-6}M): 630 ± 59 . GMPc (Emax) (n=4): basal:

115±241; C (10⁻⁶ M): 205±18 y la hidrólisis de PI (U A/mg) (Emax) (n=4): basal: 77±15; C (10⁻⁶ M): 291±17. La St no modificó los parámetros evaluados. Concluimos que existe una regulación diferencial de las señales acopladas a la estimulación muscarínica que se relacionaría con las diferencias estructurales y funcionales de ambas glándulas.

248. Efectos del haloperidol (Hal) sobre receptores (R) a neurotransmisores cerebrales y sus señales intracelulares. TG Borda, ME Sales, N Goren, C Perez, G Cremaschi.

CEFYBO-CONICET, Buenos Aires.

La acción antipsicótica del Hal depende de su antagonismo de RD₂. Los síntomas adversos del Hal se relacionarían con un bloqueo de R muscarínicos colinérgicos (M), alfa1 adrenérgicos (alfa₁) y H1. Se estudió la acción del Hal sobre los RM de corteza cerebral de rata. Por el desplazamiento de la unión del radioligando ³H-QNB corroboramos el predominio del subtipo M1. El Hal desplazó al ³H-QNB en forma concentración dependiente (c/d) con un pKi= 5.7±0.4 (n=6) y modificó la señal de transducción acoplada al mismo. Así, modificó la estimulación que el Carbacol (Carb) ejerció sobre la producción de inosítoles fosfatos (IPs) (Basal vs 10⁻⁶ M Carb, Area/mg= 35.5±3.7 vs 65.0±4.5*, n= 7, *p<0.05) en forma c/d. El Hal inhibió las concentraciones bajas de Carb (Hal+carb 10⁻⁹ M= 40.7±4.2, n=6) y potenció las altas (Hal+Carb10⁻⁶ M= 71.7± 5.6*, n=6). La potenciación fue impedida por prazosin. El Hal indujo "per se" una estimulación del ciclo de Ips (Hal= 60.2±5.3*, n=7) efecto que fue bloqueado por prazosin, pero no por antagonistas de otros R acoplados a este ciclo. Los resultados sugieren que el Hal ejerce un efecto dual antagonístico sobre la producción de IPs: inhibitorio por bloqueo M1 y estimulador por activación alfa1. Este mecanismo podría explicar algunos efectos adversos del Hal.

249. Efectos de flumazenil sobre la relajación inducida por diazepam en la vasculatura renal de rata. LA Monasterolo, L Trumper, MM Elías.

Farmacología. Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. CONICET. CIUNR. Rosario.

En nuestro laboratorio se ha demostrado que las benzodiazepinas diazepam, clonazepam y Ro 5-4864 son capaces de provocar relajación concentración-dependiente de la vasculatura del riñón aislado y perfundido con noradrenalina (NA). Fue de interés evaluar el posible rol de los receptores centrales a benzodiazepinas (RCB) en las respuestas observadas. En el riñón aislado y perfundido a flujo constante con NA 1µM se estudiaron los efectos de: flumazenil (0.2-500 µM), antagonista de RCB (F, n=4); diazepam (0.5-580µM), benzodiazepina mixta (D, n=7); D en presencia de F 10µM (D+F, n= 4); volúmenes correspondientes del solvente (C, n=3). El aumento de presión de perfusión (PP) respecto al estado basal (126 ± 4 mmHg) logrado con NA (245 ± 6 mmHg), no difirió entre los grupos estudiados. La reversión completa de este incremento en PP fue considera-

da 100% relajación. En C y F no se modificó la PP alcanzada con NA. En D y D+F se observó relajación concentración-dependiente. Cuando se evaluó la capacidad de provocar 35 % relajación en ambos grupos, se obtuvo log IC35 (µM): D= 0.58 ± 0.08; D+F= 1.86 ± 0.18*, p<0.001. Estos resultados indican que las acciones relajadoras ejercidas por diazepam sobre la vasculatura renal precontractada podrían estar mediadas, en parte, por estimulación de RCB.

250. Variaciones séricas de fibrinógeno en procesos flogísticos tratados con AINEs y LASER de Helio-Neón. V Campana, M Moya, A Gavotto, J Palma, H Juri.

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

La injuria tisular en ratas incrementa significativamente los niveles de fibrinógeno plasmático (FP) (p<0.001) comparados con animales normales. La irradiación con láser de Helio-Neón en la zona lesionada normaliza las concentraciones de FP, lo mismo ocurre al administrar Diclofenac Sódico. En ratas sin injuriar la irradiación con LASER o la inyección de Diclofenac no modifican los valores normales de FP. *Objetivo:* Estudiar el efecto sinérgico que podrían tener ambas terapias conjuntas en el postquirúrgico. *Método:* Se trabajó con 60 ratas hembras injuriadas por laparotomía, en lotes con diferentes tratamientos pre y postquirúrgico. *Resultados:* Laserterapia y la inyección de Diclofenac en forma conjunta en el posquirúrgico disminuyen significativamente los niveles de FP (155.7±36.1 mg%), comparando con lotes solamente irradiados después de la injuria (243.0±14.3 mg%) (p<0.05). En lotes tratados con Diclofenac disminuyó el nivel de FP (225.0±19.5 mg%) sin ser estadísticamente significativo. *Conclusiones:* La normalización del FP al aplicar ambas terapias conjuntas en el posquirúrgico podría deberse a la disminución de la síntesis de Prostaglandina E2 por el efecto fotoquímico y fotoeléctrico del Láser de He-Ne y a la relación inhibitoria Cox2/Cox1 del Diclofenac.

251. Chagas agudo experimental: GM1 causa sobrevida. AR Fernández, S Cossy Isasi, P Paglini y D Bronia.

Cátedra de Química Biológica y Cátedra de Física Biomédica de la Facultad de Ciencias Médicas, U N C.

Anteriormente informamos una actividad PLA modulada por GGS (ya detectada fluorométricamente) en la fusión calcio-dependiente de eritrocitos inducida *in vitro* por epimastigotes de T. cruzi. Ocurre con transferencia de ácidos grasos libres y lisofosfolípidos al eritrocito, se inhibe pretratando los parásitos con un inhibidor de PLA2 (quinacrina) y se modula con gangliósidos de cerebro bovino (GGS) que inhiben la PLA₂ (monocapas y células cultivadas *in vitro* e *in vivo*) y regulan la [Ca⁺⁺]_i. Su importancia biomédica se determinó inyectando GGS (i.m.) en ratones con infección aguda letal, observándose parasitemia disminuida, cronicidad y

sobrevida. Al sustituir GGS por GM1 (0.6, 0.3 y 0.1 mg de GM1/día durante 1 mes) se observaron parasitemias mayores que el control y en los sobrevivientes al día 12, un cuadro crónico. Con 0.1 mg de GM1 se lograron las parasitemias menores y supervivencia al mes del 80%. GM1 se comparó con ácido colomínico y fetuina (50 µg/día) (efecto del siálico). GM1 disminuyó la parasitemia por debajo de los controles, colomínico y fetuina la elevaron 200 %, siendo letales al día 16. Para probar la modulación de la $[Ca^{++}]$ se comparó con nifedipina (bloqueante de calcio inocuo al parásito, 10 µg/día) que no modificó la parasitemia. GM1 disminuiría la parasitemia sin compromiso de su resto sialilado y modularía la $[Ca^{++}]$ preferentemente en el parásito.

252. El primer componente del sistema del complemento reconoce la fracción activa de la heparina de alto peso molecular. G Calabrese, *EF Recondo y MEF de Recondo.

*Dto. de Cs Biol., Fac de Farm y Bioq y *Dto de Qca Biol, Fac de Cs Ex y Nat. Universidad de Buenos Aires.*

La heparina actúa en la regulación de diversos sistemas fisiológicos como la angiogénesis, la aterosclerosis y el sistema del complemento. En nuestro laboratorio se ha demostrado que la fracción activa de la heparina de bajo peso molecular es reconocida por el primer componente (C1) del sistema humano del complemento. En esta comunicación hemos extendido estos resultados a la heparina de alto peso molecular y se demuestra que, en condiciones muy estrictas de pH, concentración de calcio, fuerza iónica y relación C1/heparina, la fracción activa de la heparina de alto peso molecular también es reconocida por el C1. Se utiliza heparina de alto peso molecular (sal de sodio) de una actividad anticoagulante de 179,3U/mg. El C1 se aísla del plasma sanguíneo y se purifica en una columna de IgG agarosa. La interacción del C1 con la heparina de alto peso molecular se siguió leyendo la turbidez a 420nm después de 1 hora de incubación a 30 °C. A pH 6.1, concentración de calcio 2mM, fuerza iónica 25mM y relación C1/heparina=1 se logró separar la fracción activa de la heparina de alto peso molecular en el precipitado de la interacción. En efecto, se obtuvo una actividad específica de 267,87U/mg quedando en el sobrenadante una actividad de 165 U/mg. La fracción activa contenía el 45,6% de la cantidad original de heparina. La conclusión más importante es que la fracción activa de la heparina natural puede ser aislada por precipitación con C1.

253. Lisozima (LZ) urinaria y daño tubular (DT) por gentamicina (GTA). JE Toblli, P Pagano, C Nyberg, M Angerosa.

Lab. Medicina Experimental, Hospital Alemán. Buenos Aires.

LZ es una proteína de bajo peso molecular y su excreción urinaria (Ex.U) elevada se asocia a DT. El objetivo de este estudio fue determinar si la Ex.U de LZ es proporcional al DT producido por GTA. Sprague-

Dawley (n= 21) machos adultos (Fac.Cs.Vet.U.N.L.P.) (250-300g), G1 (n=7) GTA 40mg/kg/día I.P.; G2 (n=5) GTA 100mg/Kg/día I.P.; G3 (n=9) control, volumen equivalente de solución salina NaCl 0.9%/día I.P. El experimento duró 10 días. Los animales recibieron agua y alimento standard "ad libitum". Se determinó en orina de 24hs. basal y a los 10 días: creatinina (Cr.) y LZ. Todos los animales fueron sacrificados al finalizar el experimento para el estudio anatómico-patológico. La LZ se determinó por difusión radial (Kallestad Diag.-Inc.-Sanofi Diag.Pasteur Inc. Chaska, MN), previa concentración urinaria con microcentrifuge filters, ultrafree-MC NMWL 5000 (Sigma Chem. Co. St. Louis, MO). Se utilizó ANOVA y Schaffé test, $\alpha=0.05$. Día 10 ($\bar{x} \pm \text{sem}$): LZ (µg/g rat/día) # G1= 6 ± 1.17 ; G2 = 41.6 ± 3.85 ; G3 = 0.07 ± 0.01 . Cr. sangre (mg/dl) ° G1 = 1.1 ± 0.2 ; G2 = 2.2 ± 0.4 ; G3 = 0.7 ± 0.1 . # $p < 0.01$ G1 vs. G2, G3; G2 vs. G3. ° $p < 0.01$ G2 vs. G3; $p < 0.05$ G1 vs. G2, G3. Estos resultados muestran claramente una significativa correlación entre la mayor ExU de LZ y la dosis de GTA la cual ocasionó a su vez mayor daño renal objetivado por el ascenso de Cr.

254. Efectos secuenciales de una exposición crónica al aluminio en ratas. ML Calvo, S Mahieu, N Millen, M Gonzalez, M Contini.

Cat. Fisiología Humana - Fac. Bioquímica - UNL - Santa Fe.

Se ha involucrado al aluminio como agente causal de anemia. Sus efectos fueron investigados en ratas machos Wistar recién destetados. Se determinaron a los 30-60 y 90 días de intoxicación por inyección i.p. de $Al(OH)_3$, 80 mg/Kg de peso, 3 veces por semana: hemoglobina (Hb) por cianometahemoglobina, hierro (Fes) y porcentaje de saturación de la transferrina (% sat.transf.) séricos por métodos colorimétricos y albuminemia por espectrofotometría de absorción atómica. Se utilizaron 36 animales distribuidos en grupos: controles (C_{30} - C_{60} - C_{90}) y tratados (T_{30} - T_{60} - T_{90}), con n=6 cada uno. Sacrificados de a pares (C-T) a los tiempos indicados, secuencialmente los resultados fueron: Hb g/dl: 10.3 ± 0.45 / $8.83 \pm 0.23^*$ 11.52 ± 0.22 / $10.3 \pm 1.06^*$ 12.27 ± 0.6 / $11.2 \pm 0.47^*$ Fes mg/dl: 275.1 ± 49.8 / $180.54 \pm 41.69^*$ 249.06 ± 20.68 / $150.53 \pm 21.56^*$ 238.07 ± 32.44 / $157.06 \pm 32.79^*$ % sat. transf.: 49.36 ± 9.87 / $32.24 \pm 10.58^*$ 35.1 ± 6.5 / $20.98 \pm 3.77^*$ 34.45 ± 3.31 / $24.43 \pm 4.54^*$, * $p < 0.05$. Se alcanzaron albuminemias de: 201-260 y 517 µg/L en los grupos tratados. Estos hallazgos sugieren que el aluminio comprometería los niveles de Hb obstaculizando el transporte plasmático del hierro por la transferrina, no afectando los cambios por edad de los parámetros analizados.

HEMATOLOGIA II

255. Influencia de las proteínas plasmáticas sobre la agregación eritrocitaria. MI Spengler, M Rasia.

Fac. Ciencias Médicas. UNR. Rosario.

La sangre humana tiene una capacidad de agregación intermedia entre la bovina que no agrega y la equina que lo hace intensamente. Dado que la agregabilidad es atribuida a factores celulares y a la composición proteica plasmática, se estudió el rol de estas proteínas en el diferente comportamiento agregante de estas especies. La agregación eritrocitaria fue determinada por un método basado en la transmisión de luz que permite obtener dos parámetros: tamaño de los agregados (T) y velocidad de agregación (V). De cada especie se aislaron glóbulos rojos que fueron lavados y resuspendidos en PBS adicionado de PVP (polivinilpirrolidona), en una concentración adecuada para cada especie, a fin de lograr una agregación de mediana intensidad. Los parámetros obtenidos en estas condiciones fueron tomados como controles (b: bovino, h: humano, e: equino): Tb: $0,44 \pm 0,04$; Vb: $0,66 \pm 0,28$; Th: $0,86 \pm 0,01$; Vh: $6,86 \pm 0,69$; Te: $0,62 \pm 0,04$; Ve: $3,80 \pm 0,30$. I) Se reemplazó el PBS por suero homólogo. Al comparar estos valores con los controles, se observó que en los equinos aumentó T ($p < 0,05$) y V ($p < 0,05$), en los humanos aumentó V ($p < 0,05$) y en los bovinos disminuyó V ($p < 0,05$). II) Se reemplazó el PBS por plasma autólogo y se observó que respecto a I, los bovinos no mostraron diferencias, pero aumentó V en los humanos ($p < 0,05$) y equinos ($p < 0,01$). En resumen, las proteínas plasmáticas favorecen la agregación globular de equinos y humanos y desfavorecen la de bovinos. Se puede concluir en consecuencia que la causa del comportamiento no agregante de los glóbulos rojos bovinos reside en sus células (y más aún en el glicocálix) que interaccionan de modo particular con las proteínas del medio.

256. Producción diaria de eritropoyetina necesaria par el mantenimiento de la tasa normal de eritropoyesis en el ratón policitémico post-hipóxico. ME Barrio Rendo

CONICET, BioSidus, S.A. Buenos Aires.

Eritropoyetina (EPO) es una hormona indispensable para el control de la eritropoyesis, tanto en condiciones normales como patológicas. En la rata, en la que la formación de EPO endógena ha sido suprimida mediante hipertransfusión o ayuno, la administración diaria de 1.5U de la hormona mantiene una tasa normal de eritropoyesis. Ese dato importante para la programación de estudios farmacológicos, no es conocido para el ratón, siendo su determinación el objeto del presente estudio. Ratones hembras adultas de la cepa CF#1 fueron expuestas a 456 HPA 18h/día durante 3 semanas en una cámara hipobárica para inducción de policitemia (ratones PH). Al término del período de exposición y durante 4 días, grupos de 8 ratones PH recibieron 0, 0.5, 1.0, 1.5, o 2.0 U de rHu-EPO (BioSidus, SA) por vía sc. Ratones normocitémicos no inyectados fueron considerados «controles con eritropoyesis normal». Los animales recibieron 0.2 mCi ^{59}Fe por vía iv, determinándose la incorporación del radioisótopo al eritrón circulante 24 hs más tarde. Los resultados obtenidos fueron (% de dosis $\pm$ ES), ANOVA F= 54378, Test de Tukey-Kramer (q,p): 1) Control normal: 32.4 ± 1.8 ; 2) PH-EPO-0:

0.62 ± 0.02 , 16.208, < 0.001 ; 3) PH-EPO-0.5: 16.8 ± 0.9 , 10.409, < 0.001 ; 4) PH-EPO-1.0: 31.6 ± 1.5 , 0.800, > 0.05 ; 5) PH-EPO-1.5: 40.1 ± 1.3 , 5.138, < 0.01 ; 6) PH-EPO-2.0: 46.2 ± 1.8 , 9.208 < 0.001 . La única diferencia no significativa fue entre ratones controles con eritropoyesis normal y ratones PH inyectados con 1.0 U rHu-EPO. Estos resultados sugieren que aproximadamente 1.0 U de la hormona producida diariamente en un ratón hembra adulto constituye la cantidad necesaria para el mantenimiento de su tasa eritropoyética normal. Tasas secretorias superiores o inferiores inducirán policitemia o anemia respectivamente.

257. "Técnicas inmunoenzimáticas en neoplasias hematológicas": nuestra experiencia. NB Díaz, M Lardo, JR Artaza, C Carbia, A Merelli, J Sánchez Avalos.

Dpto. De Bioq. Clínica. Sección Hematología. FFyB. Hospital de Clínicas "José de San Martín". UBA. Buenos Aires.

El objetivo fué aplicar las técnicas inmunoenzimáticas para detectar antígenos (Ag) celulares mediante el uso de anticuerpos (Ac) monoclonales unidos a una enzima que al reaccionar con el Ag celular dan un complejo coloreado visible al microscopio óptico. La metodología empleada fué fosfatasa alcalina-anti fosfatasa alcalina (AFAAF), usando como sustrato el naftol AS-MX y como revelador el fast Red TR. Se empleó Ac monoclonal de ratón anti-mieloperoxidasa humana frente a líneas celulares mieloides establecidas: HL-60 (Control positivo) y U-937 (Control negativo). Se usó como control de reacción un citospin obtenido de una Leucemia Mieloide Aguda (LMA tipo 2) observándose correlación con la reacción citoquímica convencional. La aplicación de esta reacción resulta de particular interés en el subtipo de LMA- M_0 que no pueden diagnosticarse por métodos citoquímicos. Se aplicó para revelar inmunoglobulinas citoplasmáticas y de superficie: k y l en un caso de Macroglobulinemia de Waldenström y en un linfoma esplénico de células vellosas como expresión de monoclonalidad. Se concluye que éstas técnicas tienen como ventaja que se trabaja con un número reducido de células, con buena conservación de la morfología celular a través del tiempo y resultan ser un buen complemento diagnóstico de la citometría de flujo.

258. Identificación de siete mutaciones nuevas en el gen dela uroporfirinógeno decarboxilasa en pacientes argentinos con porfiria cutánea tardía M Méndez*; VE Parera*; MV Rossetti*; A De Siervi*; KH Astrin.; RJ Desnick ** y AM del C Battle***

* Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP), FCEyN, UBA-CONICET, Buenos Aires. y

** Departamento de Genética Humana, Mount Sinai School of Medicine, Nueva York, EE UU.

La Uroporfirinógeno Decarboxilasa (URO-D) es la quinta enzima del camino biosintético del hemo. La disminución en su actividad causa dos tipos de porfirias:

Porfiria Cutánea Tardía (PCT) y Porfiria Hepatoeritropoyética. La PCT es la más frecuente en nuestro país y puede ser hereditaria (PCT-F) o adquirida. Para identificar mutaciones en la URO-D se realizaron estudios sobre linfocitos de sangre periférica en pacientes PCT-F. Se extrajo el RNA y mediante una RT-PCR se amplificaron las casi 1,2 kb del cDNA. En paralelo se extrajo el DNA genómico y mediante una long range PCR se amplificaron las 3 kb del gen. En ambos casos los productos fueron secuenciados cíclicamente. Con esta metodología se detectaron 7 mutaciones nuevas: cuatro puntuales missense (M165R, L195F, N304K y R332H); una inserción (30insA); una delección de 1060 pb la cual se extiende desde el exón 2 hasta la mitad del exón 6 que presenta una repetición directa de 10 pb (GATCGCCAGA) flanqueando el 5' breakpoint y una mutación de splicing causada por la transición G→A en la última base del exón 9 (E314E) que produce el skipping del mismo, confirmado por la presencia de dos bandas de distinto tamaño en la RT-PCR, la menor de las cuales carecía de las 67 bases de dicho exón lo cual fue comprobado por secuenciación. La identificación de estas mutaciones incrementa notablemente el número de mutaciones publicadas en la URO-D.

- 259. Porfiria aguda intermitente: detección de 9 mutaciones nuevas en el gen de la porfobilinogeno-deaminasa.** A De Siervi*, MV Rossetti*, V Parera*, M Méndez*, K Astrin**, R Desnick** y A. Batlle*

*Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)-FCEyN-Universidad de Buenos Aires

**Department of Human Genetics-Mount Sinai Hospital-NY-USA.

La porfiria aguda intermitente (PAI) es un desorden autosómico dominante provocado por una deficiencia parcial de la enzima Porfobilinogeno-Deaminasa (PBG-D) que cataliza la síntesis del Uroporfirinógeno I. La medición de su actividad, reducida un 50% en pacientes con PAI, no es un dato absolutamente seguro para su diagnóstico dado que hay un solapamiento entre valores normales y patológicos. Además, existe un alto porcentaje de portadores asintomáticos, en las familias afectadas en los cuales diferentes factores tanto endógenos como exógenos, pueden desencadenar la enfermedad. Por lo tanto hemos iniciado el análisis a nivel genético de los pacientes porfíricos con el objetivo de hacerlo extensivo a sus familiares. Se extrajo el DNA a partir de cultivos de linfoblastos. Se realizaron dos «long range» PCR para amplificar todo el gen de la PBG-D (15 exones); los productos de las mismas purificados se secuenciaron directamente con los primers específicos para abarcar todos los exones, intrones y regiones promotoras. En las familias estudiadas se identificaron las siguientes mutaciones: 2 puntuales que producen cambio de aminoácidos (Q34P y G335S), 1 en el sitio de splicing (IV S12+1), 5 delecciones (666delGG, 728delG, 815delAGGA, 948delA y 980delT) y una inserción 913insC. Estos resultados incrementan a setenta el número de mutaciones diferentes que son responsables de

esta patología, confirmando de esta forma la ya conocida heterogeneidad genética de esta porfiria.

- 260a. Efecto de la eritropoyetina recombinante humana (rhEpo) sobre la eritropoyesis de estrés I. Producción eritroide.** S Mide, P Huygens, C Bozzini. C. Fisiología, F.

Odontología, Universidad de Buenos Aires.

La función de la Epo en la regulación de la eritropoyesis ha sido establecida (Bozzini), pero no la producción eritroide en los órganos hemopoyéticos en el estrés (hipoxia-hipóxica), que se presenta en esta comunicación. El estudio se realizó en ratones adultos CF1. Se trataron con altura simulada durante 21 días (T0), a los 4 días de posthipoxia (T4) se inyectaron con 1u.rh Epo sc. A las 24 hs se evaluaron con hematimetría y cultivos de médula ósea (MO) y Bazo (B) para determinar: Unidad Formadora de Bursts Eritroides Inmaduros (BFU-EI), Maduros (BFU-EM) y Unidad Formadora de Colonias Eritroides (CFU-E) (Peschle). Se determinó la eficiencia de producción total de progenitores (P) del organismo con la fórmula: (P de MO de 1 fémur x 17+P del B). A los datos se aplicó el test de Newman Keul's. Se halló que en relación al control (C) (1 BFU-EI producía 45 BFU-EM y 230 CFU-E) la eficiencia de producción de CFU-E disminuía en T0 y T4. La rhEpo produjo un cambio en la relación: 1 BFU-EI daba 14 BFU-EM y 134 CFU-E, que mostró la disminución de diferenciación a partir de BFU-EI, mayor amplificación de BFU-EM y mayor producción de CFU-E en relación al C ($p < 0.01$). Comparando la producción de CFU-E en los órganos hemopoyéticos, ésta fue menor en B que en MO, en el C y en rhEpo (B1: 6:49 vs MO1: 22:219) ($p < 0.001$) debido a la disminución del número y de la amplificación de BFU-EM de B ($p < 0.05$). Se destaca la menor producción de CFU-E en B, órgano de respuesta primaria en este modelo experimental.

- 260b. Efecto de la eritropoyetina recombinante humana (rhEpo) en la eritropoyesis de estrés. II Dinámica de la eritropoyesis.** S Mide, P Huygens, C Bozzini.

C. Fisiología. F Odontología Universidad de Buenos Aires.

En el trabajo presentado previamente analizamos la producción de CFU-E en ratones CF1 sometidos a situaciones de estrés eritropoyético. Con la misma metodología comparamos el número de progenitores eritroides en médula ósea (MO) y Bazo (B en Hipoxia (T0), Posthipoxia (T4), rhEpo (Epo) y Control (C) para analizar la dinámica del sistema, lo que motiva esta presentación. Los datos indican una disminución de CFU-E totales en T0 (204 ± 10.7) $\times 10^3$ y en T4 (145 ± 2.9) $\times 10^3$ ($p < 0.001$) y un aumento con Epo (669 ± 20.4) $\times 10^3$ en relación al C (599 ± 12) $\times 10^3$ ($p < 0.05$), con una distribución similar en MO y B. Las BFU-EM totales (C: 118 ± 10.0) $\times 10^3$ no varían en T0 y T4 pero hay cambios en la distribución de progenitores en T4, en MO (108 ± 1) $\times 10^3$ y en B (17.3 ± 3.1) $\times 10^3$. Las BFU-EI totales (2.60

$\pm 0.26) \times 10^3$ no varían en T0 en número ni en distribución. En T4 hay una disminución total uniforme de estos progenitores en MO y B. La Epo incrementa el número de BFU-EI totales $(4.5 \pm 0.17) \times 10^3$, que se distribuye en MO $(2.5 \pm 0.02) \times 10^3$ y en B $(2.0 \pm 0.17) \times 10^3$. El aumento es del 68% en la primera y del 100% en B en relación al C. Estos resultados y la observación de que estas colonias esplénicas son de mayor tamaño y viabilidad que las de MO (lisis en B: día 11 vs en MO: día 7), indicarían que el incremento de BFU-EI en B por efecto de la Epo sería debido a la migración de estos progenitores de MO a B que presenta un microambiente más favorable para su desarrollo.

- 261. Monitoreo de la respuesta a la desmopresina (DDAVP) en pacientes con enfermedad de von willebrand (vW) utilizando el ensayo del enlace al colágeno.** CE FarRas, AC Kempfer, S Meschengieser, A Woods, A Blanco, MA Lazzari. Academia Nacional de Medicina. CONICET. Buenos Aires.

Describimos el uso del ensayo del enlace al colágeno para mejorar el monitoreo de laboratorio en la terapia con DDAVP en pacientes con enfermedad de vW. Evaluamos la respuesta en 11 pacientes con enfermedad de vW a los 60min, 120min y 24h (10 tipo I y uno tipo II) posteriores a la administración de DDAVP, según el protocolo estándar. El método original es enzoinmunoensayo, modificado por nosotros: se empleó colágeno (Sigma) reconstituido en tampón fosfatos-salino pH:7.3, diluido a 0,1 mg/ml y para la determinación del vWf unido se utilizó la visualización con el complejo avidina-biotina-peroxidasa. Se evaluó paralelamente el vWf:Ag por inmunoelectroforesis y la actividad de cofactor de la ristocetina en todas las muestras plasmáticas. Aunque los valores absolutos del vWf:Ag varían entre los pacientes, el ensayo de enlace al colágeno mostró un aumento de 3 veces (rango 2.6-3.5) a los 60min y de 4 veces (rango 3-4.8) a los 120min, en comparación con los valores basales, considerando una media entre la muestra pre y el post 24h. El ensayo permite obtener otro dato acerca de la capacidad funcional de los multímeros grandes del vWf.

- 262. Estudio de los genes supresores de tumor p15 y p16 en leucemia imloide crónica (LMC).** IA Giere, IR Slavutsky, IB Larripa.

Depto Genética. II Hema. Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires.

Las secuencias supresoras p15 y p16 codifican proteínas inhibidoras de quinasas dependientes de ciclinas, que normalmente participan del control del ciclo celular. Estos genes mapean en 9p21-22 junto a la familia de genes de interferon (IFN). Recientemente se describieron deleciones hemi-homocigotas de estas secuencias en neoplasias linfoides y en tumores sólidos. En este trabajo se presenta el estudio molecular de 30 casos de LMC en fase crónica a fin de determinar si la pérdida o reordenamientos de estas secuencias supresoras están involucradas en la proliferación maligna de esta enfer-

medad. El análisis molecular se efectuó por Southern blot y dot blot hibridando con las sondas p16cDNA y pTR48 (Transferrin receptor clon) y posterior evaluación de las placas autoradiográficas por densitometría. En ningún caso se observaron rearrreglos ni deleciones homocigotas. El análisis densitométrico comparativo demostró ausencia de deleciones hemicigotas. Estos hallazgos indican que la pérdida y reordenamientos de los genes p15 y p16 son eventos infrecuentes en la fase estable de la LMC.

- 263. Los sitios fragiles (SF) no estarían relacionados con el origen de las alteraciones cromosómicas clonales en leucemias.** A Fundia, S Acevedo, I Larripa.

Depto de Genética, II Hema, Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires.

Se evaluó la expresión de SF en 16 pacientes con leucemia: 9 con LMA y 7 con LMC junto con 7 individuos sanos, en cultivos de 3 días de sangre periférica. Se determinó el cariotipo de las células leucémicas en cultivos de 24 hs de médula ósea, evaluando al menos 11 metafases con bandeado G. La inducción de SF se efectuó agregando BUDR (50 ug/ml) o FUDR (10 ug/ml) y analizando 50-100 metafases con coloración clásica y bandeado G secuencial. Se definieron como SF las bandas coincidentes en el 50% de los pacientes. Todos los casos de LMC presentaron la t(9;22) (q34;q11). Un total de 75/249 y 134/317 anomalías cromosómicas (AC) inducidas por BUDR y FUDR fueron definidas como SF, localizadas en 7 y 11 bandas específicas, no observándose las bandas 9q34 o 22q11, involucradas en el cromosoma Ph1. En LMA se encontraron 4 individuos con cariotipo normal y los restantes presentaron las siguientes alteraciones estructurales t(3;8) (q11;q13), del (5)(p11), t(3;11) (q21; p15), inv(16) (p13;q22), t(9;22) y del9q. Con BUDR se definieron como SF 60/142 AC, mientras que con FUDR se definieron 40/108 AC, ubicados en 7 y 9 bandas específicas. No se identificaron SF en los puntos de ruptura implicados en AC estructurales. Estos resultados sugieren que los SF no estarían involucrados con el origen de los marcadores cromosómicos hallados en estas neoplasias.

- 264. Factores determinantes del síndrome de hiperviscosidad en la artritis reumatoidea.** A Luquita*, AM Gennaro#, L Urli*, R Volpintesta*, S Palatnik*, M. Rasia*.

()Fac. Cs. Médicas. UNR. (#)INTEC. CONICET. (UNL). Santa Fé.*

El objetivo de este trabajo es analizar los factores que determinan la hiperviscosidad que acompaña la artritis reumatoidea. Para ello se estudiaron 24 mujeres seleccionadas de acuerdo a los criterios de la Asociación Americana de Reumatología y 8 controles de similar edad (48 ± 13 años). En las pacientes se encontraron significativamente aumentados ($p < 0.001$): viscosidad plasmática (hp) y sanguínea (hs), fluidez de membrana (T//), filtrabilidad eritrocitaria y concentración de he-

moglobina corpuscular media, además de: eritrosedimentación (VES), concentración de proteínas IgG, IgM y fibrinógeno. En cambio no hubo diferencias significativas en hematócrito (Hto), forma globular y volumen corpuscular medio. Se encontró correlación entre la hp y el contenido de IgG ($r = 0,64$, $p < 0,001$) y también el de IgM ($r = 1,07$, $p < 0,001$). La hs correlacionó significativamente con el Hto ($r = 0,88$, $p < 0,001$) y positivamente pero sin alcanzar significación con filtrabilidad eritrocitaria y con VES. Como era predecible, la disproteinemia característica de esta patología explica el aumento de la hp. Pero la hp no es la única determinante de la hiperviscosidad en estos pacientes. El aumento paralelo de la hs relativa evidencia que se asocian también alteraciones de los parámetros celulares: consecuentemente con la disminución de la fluidez de membrana, los eritrocitos de los pacientes son más rígidos y tienen aumentada su tendencia agregante.

265. Enfermedad hepática severa y activación plaquetaria. MV Silva, S Ouviaña, NL Zanaro, MC Romero, B Sassetti.

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

La enfermedad hepática severa se acompaña de una hemostasia alterada a nivel plasmático y plaquetario. Estudiamos 15 pacientes con enfermedad hepática severa: 10 cirrosis (3 autoinmunes, 3 etílicas, 2 criptogénicas, 1 biliar secundaria y 1 post hepatitis C), 3 amiloidosis portuguesas, 1 Wilson y 1 inmunocolangitis, inscriptos en el programa de trasplante hepático, ninguno con coagulación intravascular diseminada en el momento del estudio y 15 controles normales con el fin de determinar marcadores tempranos de activación plaquetaria. Se determinó P-selectina (CD62P) y GP-53 (CD63) por citometría de flujo. Se obtuvo CD62P: (media $\pm$ SD) $82,57 \pm 14,76$ %; CD63: $80,50 \pm 13,85$ %. Controles normales: hasta 5%. Control positivo (plaquetas activadas con trombina 1U/ml): CD62P = 95 ± 2 %; CD63 = 92 ± 3 %. Recuento de plaquetas: $116,66 \pm 54,38 \times 10^9$ /l. El resto de los parámetros estudiados: coagulograma, enzimas, proteínas y función hepática mostraron las alteraciones habituales de esta patología. Se halló una importante expresión de CD62P y CD63 en la membrana plaquetaria que sólo es posible después de la acción de trombina, ADP, etc, no hallándose en las plaquetas normales en reposo. Los recuentos plaquetarios más bajos se acompañaron de una menor expresión de estos marcadores sugiriendo una población plaquetaria mixta, la liberación parcial de P-selectina o bien la formación de microagregados plaquetarios. El monitoreo de estos marcadores es útil para un control terapéutico más adecuado de estos pacientes.

266. Estudio hemorreológico de ratas genéticamente obesas y sus testigos normales. C Dabin, MC Gayol, G Hernandez, M Rasia.

Fac. de Cs. Médicas. UNR. Rosario, Santa Fé.

El presente trabajo es una comparación del comportamiento reológico de dos líneas de ratas endocriadas, autóctonas provenientes de un tronco común: la línea β genéticamente obesa, diabética e hipertensa y la línea α , control no obeso. En muestras de sangre de ratas macho de 100, 200 y 300 días de edad se encontraron valores mayores para la línea β de glicemia basal y biomasa a todas las edades ($p < 0,05$). En las muestras se determinaron además: hematócrito, viscosidad sanguínea (η_s) y deformabilidad eritrocitaria. El hematócrito resultó homogéneo para todas las muestras. La η_s demostró depender de la edad en ambas líneas (η_s a 46 s-1 en mPa.s: $\alpha 200$: $5,8 \pm 1,04$; $\alpha 300$: $7,9 \pm 0,85$ ($p < 0,01$); $\beta 100$: $5,83 \pm 1,52$; $\beta 200$: $10,17 \pm 1,89$ ($p < 0,001$)). Resultados que difieren con igual significación se obtuvieron a velocidades de cizallamiento más altas: 115 y 230 s-1. Se puede observar además, diferencias entre líneas a los 200 días ($p < 0,001$). Corroborando la reconocida relación entre la hs y la deformabilidad globular, el análisis de este parámetro demostró que los animales de la línea α mantienen la deformabilidad eritrocitaria a través de las edades, no así los de la línea β cuyos glóbulos rojos se tornan menos filtrables a medida que envejecen ($p < 0,05$). En conclusión, es evidente que la patología de β tiene manifestaciones en la reología sanguínea que se agravan durante la maduración y el envejecimiento de los animales.

INFECCIOSAS II

267. Efecto de quinolonas sobre hidrofobicidad y hemoaglutinación bacteriana. C Balagué, A Juaniz, R Marí, R Astesana, H Botai, JJ Ivancovich, L Fernandez

Microbiología Clínica 1, Facultad de Cs Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. Suipacha 531 Rosario

Introducción Las cepas uropatógenas de *Escherichia coli*, presentan en su superficie externa fimbrias tipo manosa sensible (MS) o manosa resistente (MR) con capacidad de aglutinar eritrocitos humanos. La expresión de fimbrias MR y elevada hidrofobicidad definen a las bacterias como pielonefriticas por lo cual es de interés analizar el efecto de antibióticos sobre la hemoaglutinación mediada por cepas de *Escherichia coli* con fimbrias MR y elevado grado de hidrofobicidad. **Metodología** Las veintiseis cepas estudiadas fueron aisladas de orinas de pacientes con diagnóstico de infección urinaria, con las cuales se realizaron los ensayos de hemoaglutinación de eritrocitos humanos grupo A, tratados con y sin manosa y variación de la capacidad hemoaglutinante en presencia de concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacina (Cip) y nor-floxacina (Nor) por método espectrofotométrico. El grado de hidrofobicidad se determinó por coeficiente de partición con xileno, en las cepas sin y con tratamiento antibiótico. **Resultados.** El estudio estadístico de los datos, indica que las cepas tratadas con Cip aumentan levemente su hidrofobicidad y hemoaglutinación ($p < 0,10$), a dife-

rencia, con Nor no se observa variación. **Conclusiones.** Es de destacar que concentraciones subinhibitorias la ciprofloxacina puede favorecer la colonización del tracto urinario.

- 268. Recurrencias de infecciones urinarias: relación entre marcadores fenotípicos y genotípicos de enterobacterias.** A Limanski, I Torresani, C Balagué, A Viale, L Fernández.

Microbiología Clínica 1, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas UNR Suipacha 531. Rosario

El segundo episodio de una infección urinaria (IU) puede ser una recidiva o reinfección, según sea la bacteria causante la misma u otra diferente del primer episodio. Se analizó en seis cepas de *Escherichia coli* y dos de *Kebsiella pneumoniae* aisladas de dos episodios de IU, tipo de fimbria y producción de hemolisinas en relación a marcadores genotípicos (MG). Se realizaron ensayos de hemoaglutinación, con y sin manosa, producción de hemolisinas. Los MG fueron analizados por reacción en cadena de la polimerasa con cebadores arbitrarios. Resultando, que para cepas de *Escherichia coli* y de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de dos pacientes, con dos episodios de IU, con un intervalo menor de 15 días, existe relación entre genotipo y fenotipo sugiriendo una recidiva. En cambio para las otras cepas de *Escherichia coli* aisladas también de dos episodios de IU producidos con una diferencia mayor de 15 días, no hay relación entre genotipo y fenotipo. Indicaría, un cuadro clínico de reinfección, en un caso en que cepas que expresan los mismos marcadores fenotípicos (MF), presentaron genotipo diferentes. A diferencia, en un segundo caso la igualdad del genotipo y la diferencia en el fenotipo, sugieren dificultad en la expresión de los MF y/o insuficiente poder discriminatorio de los MG.

- 269. P-20: una proteína expresada en fase estacionaria por *escherichia coli* enteroagregativa (EAC).** 1MA Almirón, 1M Panagópulo, 2N Sanjuan.

1Inst. Nac. de Microbiología "Carlos G Malbrán". 2Dept. Microbiología. Fac. Medicina (Universidad de Buenos Aires).

El propósito de este trabajo fue detectar nuevas proteínas expresadas en fase estacionaria por EAEC. Se construyó un mutante de la cepa prototipo EAEC, por transducción con el fago P1vir y recombinación en el gen que codifica el factor de transcripción de la fase estacionaria. Se analizaron por SDS-PAGE proteínas totales y superficiales de ambas cepas en fases log y estacionaria, y a 16° y 37°. Se identificó una proteína de aproximadamente 20kda en el extracto salino de la cepa EAEC, exclusivamente en fase estacionaria, y a 37° pero no a 16°. Por microscopía electrónica con tinción negativa se observaron estructuras fibrilares de aproximadamente 20 nm de diámetro presentes en la EAEC, tanto en el extracto salino cuanto en la superficie de las bacterias. Dado su peso molecular, localización y regulación por

la temperatura, P-20 sería una subunidad de fimbria no descrita, cuya transcripción estaría activada durante un período de estrés como lo es la fase estacionaria.

- 270. Serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas, enzoinmuno- ensayo (EIA) desarrollado con antígenos recombinantes de *T.cruzi*.** AC Pastini*, SR Iglesias*, AH Alvarez Novoa*, J Rey*, A Tomeo*, MM Buchan*, LH Cameron*, RC Crerar*, RL Lamotte*, y VC Carricarte*.

Gador S.A., Buenos Aires, Hospital de Clínicas José de San Martín, Buenos Aires#, Omega DiagnostiCS Limited, Escocia, Reino Unido&.*

Un nuevo EIA para la detección de anticuerpos contra *T.cruzi*, *T.cruzi* IgG EIA (Quorum Diagnostics, Inc), desarrollado en Omega Diagnostic Limited, utiliza una mezcla de los antígenos recombinantes de *T. cruzi* 1, 2, SAPA, 13 y 30. La evaluación del EIA se realizó con 176 sueros positivos por hemaglutinación indirecta (HAI, Polychaco S.A.C.I.), EIA (Abbott Chagas Anticorpos 1ra generación y Dia Kit Bio-Chagas, Gador S.A.) e inmunofluorescencia de los cuales 173 (98.3%) fueron positivos y con 458 sueros de dadores de banco de sangre con determinaciones paralelas por HAI y EIA (Abbott Chagas Anticorpos 2da generación) de los cuales 5 sueros positivos fueron positivos y de los 453 sueros negativos, 446 (98.4%) fueron negativos. Cuando el EIA se llevó a cabo con 82 sueros positivos por Xenodiagnóstico, la sensibilidad fue del 100%. No se observó reactividad cruzada con 17 sueros de pacientes con toxoplasmosis, 8 con hidatidosis, 11 con tuberculosis, 16 con sífilis, y 22 con enfermedades autoinmunes. El EIA en desarrollo es sensible, específico, reproducible y adecuado para ser automatizado.

- 271. Evaluación del tratamiento con clomipramina en la infección por *T. cruzi*, cepa Tulahuen.** HW Rivarola, AR Fernández, JE Enders, N Miler, P Paglini.

Cát. de Física Biomédica, Inst. de Fisiología, Fac. Cs. Médicas, (U.N.Cba.)

La clomipramina (Clo), utilizada como antidepresiva, tiene efecto letal sobre el *T. cruzi*, cepa Tulahuen, "in vitro". Para evaluar su efecto "in vivo" se utilizaron 100 ratones en 4 grupos; un grupo sin infectar (N) y 3 infectados con 50 tripomastigotes/animal, organizados como: a) sin tratamiento, b) tratados con Clo 5 mg/día por 30 días y c) tratados con Clo 40 mg a los 60 min. post-inoculación (p.i) y a los 7 días p.i. El seguimiento se realizó hasta los 75 días p.i en: parasitemia, serología, electrocardiografía y determinación de densidad y afinidad de los receptores b-cardíacos al final del experimento. Las parasitemias de los grupos tratados fueron menores que las del control ($p < 0.01$), negativizándose a los 35 días p.i, sin embargo las serologías fueron siempre positivas. Aunque la mortalidad de los ratones tratados disminuyó en un 20%, los 3 grupos mostraron alteraciones electrocardiográficas. El análisis de los receptores se efectuó en fracción microsomal de ventrículos

con dihidroalprenolol tritiado con y sin 1 μ M de propranolol. La afinidad (K_d en nM) fue: $7,04 \pm 0,46$; $0,9 \pm 0,18$; $2,92 \pm 0,53$; $3,77 \pm 0,31$ y la densidad (B_{max} en fmol/mg.prot): $77,46 \pm 2,01$; $30,42 \pm 1,60$; $55,66 \pm 4,12$; $73,65 \pm 2,88$; en a, b, c y N respectivamente. En el grupo b la K_d fue mayor que las de los grupos a y N ($p < 0,001$) y las B_{max} fueron menores ($p < 0,001$). El grupo c presentó una K_d mayor que la del a ($p < 0,001$) y la B_{max} del c fue menor que las de a y N ($p < 0,01$). Estos resultados muestran que si bien Clo tiene efecto letal sobre el T. cruzi, cepa Tulahuen, reduciendo parasitemia y mortalidad del huésped, no alcanza a revertir la evolución natural de la infección en este modelo experimental.

272. Infección por virus junin (VJ) de Calomys musculus (Cm) en áreas con diferente situación epidemiológica para fiebre hemorrágica argentina (FHA). J García, G Calderón, M Sabbatini, D Enria.

INEVH Dr. J. Maiztegui (2700), Pergamino, Buenos Aires.

Para establecer indicadores de riesgo de contraer la FHA se vienen realizando estudios sobre la distribución del virus Junin en sus reservorios naturales. Para tal fin, durante el período 1991-1994 se realizaron capturas de microrroedores en 14 localidades de la zona pampeana, clasificadas según la incidencia de la enfermedad en: Epidémicas, históricas y no endémicas. En este trabajo se informa el aislamiento de VJ en Cm, el reservorio principal del VJ. Los intentos de aislamiento se realizaron a partir de suspensiones de cerebro en células Vero. Al día 11 post inoculación se cosecharon los sobrenadantes (sn) y se realizó inmunofluorescencia indirecta (IFI) en las células usando antisueros anti VJ, LCM y Oliveros. Todos los sn de los cultivos provenientes de las células con IFI positiva y un 10% de los negativos se sometieron a titulación por el ensayo de formación de placas bajo agarosa. De los 8350 roedores capturados, 1259 (15,1%) fueron Cm, de los que se procesaron 1172 (93,1%). Entre éstos, 10 fueron positivos en las IFI para VJ (0,85%), siendo negativos para los otros arnavirus estudiados. La titulación de los sn fue positiva en todos los casos con títulos entre 100.000 y 1.400.000 ufp/ml. Los Cm infectados pertenecen a: Zona epidémica: Alcorta: 2/90 (2,22%), Máximo Paz: 1/93 (1,08%), San Pedro: 2/188 (1,06%). Zona Histórica: Melo: 1/321 (0,31%). Zona o endémica: Zárate: 4/79 (5,06%). Los resultados muestran la actividad del VJ no sólo en zonas de alta incidencia de la enfermedad sino también en áreas donde no se detectaron casos en los últimos años y en regiones donde aún no se la ha otificado y advierte sobre una posible expansión de la enfermedad hacia el Este y sobre un posible rebrote en zonas consideradas históricas.

273. Estudio comparativo entre los niveles de interferón α (IFN) endógeno en individuos vacunados con Candid 1 y en enfermos de fiebre hemorrágica argentina (FHA). M Saavedra, J Sottosanti, L Riera, A Ambrosio.

INEVH "Dr. J. Maiztegui.", Pergamino, Buenos Aires.

Estudios previos han demostrado elevados niveles de IFN endógeno en la fase aguda de la FHA (64-32000 UI/ml). En este trabajo se estudiaron los niveles de IFN endógeno en vacunados para evaluar su utilidad como indicador de enfermedad (FHA) post vacunal. Se estudiaron cuatro grupos: a) individuos sanos ($n=20$), b) vacunados con Candid 1 que seroconvirtieron ($n=29$), c) vacunados con Candid 1 que no seroconvirtieron y enfermaron de FHA entre 1 y 5 años post vacunación ($n=5$), d) no vacunados que enfermaron de FHA ($n=25$). Las determinaciones de IFN α se realizaron por la técnica de inhibición del efecto citopático del virus de la estomatitis vesicular en monocapas de células Wish. Los niveles de IFN α obtenidos fueron: a) 8-32 UI/ml, b) 8-32 UI/ml, c) 128-8000 UI/ml, d) 64-16000 UI/ml. Se encontró que los niveles de IFN α en los grupos c) y d) eran significativamente más altos que en el grupo b) ($p < 0,001$). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de IFN α entre los grupos a) y b) ni entre los grupos c) y d) ($p > 0,05$). Estos resultados indican que el nivel de IFN α puede utilizarse como indicador de infección natural por virus Junin en individuos vacunados.

274. Efecto diferencial de la endotoxina (LPS) sobre la fagocitosis en macrófagos pulmonares alveolares (PAMs) e intravasculares (PIMs). DR Tasat y AE Warner.

Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad General de San Martín, Buenos Aires. Arg., Harvard School of Public Health, Boston, MA., U.S.A. (Presentado por M. Pisarev)

Algunas endotoxinas bacterianas juegan un rol esencial en la patogenia del Síndrome del Distres Respiratorio del Adulto (ARDS). Investigamos el efecto de LPS sobre la incorporación de microesferas de latex fluorescentes (2.2 μ m) opsonizadas con albúmina en PAMs obtenidos por lavado bronqueoalveolar y PIMs obtenidos mediante digestión enzimática en cultivos de 24 y 72 hs. En ausencia de LPS el porcentaje de fagocitosis fue mayor para PIMs que para PAMs. Sin embargo los PAMs estimulados con LPS (0.1-1 μ g/ml) durante 5 hs. mostraron un incremento dosis dependiente. La ingestión por PIMs no mostró diferencias significativas entre controles (C) y experimentales (LPS) a las 24 pero sí a las 72 hs ($P < 0,01$). También hemos comprobado mediante técnicas magnetométricas que estas dos poblaciones celulares poseen diferencias en cuanto a su movilidad intracelular y viscoelasticidad citoplasmática. Estos resultados demuestran que 1- la capacidad fagocítica de los PIMs no se encuentra alterada luego del tratamiento enzimático necesario para su aislamiento, 2- LPS incrementa la actividad fagocítica en PAMs y PIMs a distintos tiempos en cultivo, 3- las poblaciones de macrófagos pulmonares estudiadas presentan comportamientos fisiológicos diferenciales.

275. Porfiria cutánea tarda (PCT). Asociación con infección por virus de hepatitis y de la inmunodeficiencia humana. M Méndez*, M Sawicki**, H Muramatsu*, T Schroder**, E

Alvarez***, G Theiler**, H Fainboim**, A Battle*, V Parera*.

*CIPYP-FCEN, Universidad de Buenos Aires-CONICET, **U4, Hospital Muñiz, ***Hospital Posadas.

La PCT es la porfiria más frecuente en nuestro país y generalmente está asociada a daño hepático. El abuso de alcohol, hormonas y drogas son factores desencadenantes tanto de la manifestación clínica como de la disfunción hepática. Se estudió la prevalencia del HCV, HBV, HIV y la influencia del alcohol y el uso de estrógenos como factores de riesgo en 86 pacientes PCT (63 hombres y 23 mujeres), edad promedio 51,7 años (20-76 años). El diagnóstico de porfiria se hizo en base al cuadro clínico y se confirmó con las porfirinas urinarias, índice de porfirinas plasmáticas y cromatografía de porfirinas urinarias con patrón característico para PCT. Se realizó enzimo-inmunoanálisis para detectar antígeno de superficie (HbsAg) del virus B, anti HCV y anti HIV y se determinó alanina transaminasa (ALT). En 34 pacientes se realizó punción biopsia hepática (PBH). El 33,7% fueron HCV+, 18,6% HBV+ y 9,3% HIV+. De las 34 PBH, 24 eran hepatitis crónicas (15 HCV, 2 HBsAg, 7 criptogénicas), 3 cirrosis (HCV+), 2 esteatohepatitis no alcohólica, 3 fibrosis y 2 daño hepático alcohólico. La ALT estuvo elevada en 52 (60,4%), 2 pacientes estaban en terapia por estrógenos y 36 (42%) eran alcohólicos. Estos resultados muestran que el daño hepático en la PCT es etiológicamente multifactorial, siendo HCV y HBV los principales factores patogénicos asociados.

275b. Subclases de inmunoglobulinas G (IgG) en la infección humana por virus Junin (VJ). M Saavedra, J Sottosanti, L Riera, A Ambrosio.

INEVH «Dr J. Maiztegui». Pergamino. Buenos Aires.

Estudios previos han sugerido la producción preferencial de subclases de IgG como respuesta a la infección por diferentes agentes virales. El objetivo de este trabajo fue estudiar las subclases de IgG en la respuesta inmune a infección humana por VJ. Se estudiaron 16 enfermos de Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) y 10 vacunados con Candid 1. Se tomaron muestras de suero a los 30, 60, 90 días posteriores al comienzo de los síntomas de FHA y a los 30 y 60 días postvacunación respectivamente. La técnica utilizada fue inmunofluorescencia indirecta (IFI) en células Vero infectadas con VJ. Se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-IgG₁, anti-IgG₂, anti-IgG₃ y anti-IgG₄ humanos, conjugados con FITC. Los resultados obtenidos fueron: a) En 10/10 vacunados y en 6/6 enfermos con forma clínica leve (100%) solo se detectó IgG₁ (Título:16-256); b) En 5/10 enfermos (50%) con formas más severas se encontró IgG₁ (Título:64-512) e IgG₃ (Título:8-16); c) No se detectó IgG₂ ni IgG₄ en ningún individuo. Se concluye que la producción preferencial de IgG₁ y ausencia de IgG₂ son características de la respuesta en los casos leves de FHA y en vacunados con Candid 1, mientras IgG₃ aparecería más relacionada a formas clínicas más severas de FHA.

METABOLISMO

276. Efecto de tóxicos aromáticos polihalogenados sobre enzimas lipogénicas de tejido adiposo marrón. L Alvarez, P Alvarez, A Randi, R Kolliker, DL Kleiman.

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

El hexaclorobenceno (HCB) es un contaminante ambiental de alta persistencia, inductor de enzimas microsomales hepáticas, disfunciones tiroideas, porfiria y cáncer, que se acumula en el tejido adiposo marrón (TAM). La actividad de las enzimas lipogénicas en el TAM está bajo un complejo control hormonal y neural. Asimismo el TAM es un tejido termogénico. En trabajos previos hemos demostrado que el HCB induce la actividad de enzimas lipogénicas hepáticas en forma hormono-tiroidea dependiente. En este trabajo examinamos el efecto del HCB sobre la actividad de la Enzima málica (EM), glucosa6P deshidrogenasa (G6PD) y la enzima mitocondrial α -glicerolP deshidrogenasa (α -GPD) cuya actividad es paralela con la respuesta termogénica, en TAM de ratas Wistar macho intoxicadas con HCB (1g/kg p.c.) durante 30 días. Nuestros resultados mostraron que a diferencia de lo que ocurre en hígado, el HCB disminuye la actividad de la EM (C:91,49 $\pm$ 9,84; HCB: 45,21 $\pm$ 6,43 nmol/mg/ min, p<0,05) y de G6PD (C:166,13 $\pm$ 10,97; HCB:68,75 $\pm$ 9,46 nmol/mg/min p<0,02) sin alterar la de la μ -GPD (C:1,84 $\pm$ 0,36; HCB:2,04 $\pm$ 0,04 nmoles/mg/min). Las curvas de actividad enzimática vs tiempo, y dosis-respuesta (HCB: 0,25, 0,5 y 1 g/kg p.c.) mostraron un efecto significativo con HCB (1g/kg pc) a las 3 semanas de tratamiento. La tiroidectomía anulaba el efecto del HCB. Conclusión: El HCB disminuye la actividad de las enzimas lipogénicas en grasa parda, en forma hormono tiroidea-dependiente.

277. Regulación de la síntesis de ácido hialurónico y proteoglicanos de condroitín sulfato durante la diferenciación adipocítica de células 3T3-L1. CF Zizola, M Yanagishita, ME Sanchez Ruiz, MS Kruse, OP Pignataro, JC Calvo.

IBYME, Buenos Aires y NIDR, Maryland, USA.

En una reunión previa (1994), presentamos evidencia de la síntesis aumentada de ácido hialurónico y proteoglicanos de condroitín sulfato durante la diferenciación a adipocitos de los fibroblastos 3T3-L1. En el presente trabajo estudiamos los factores responsables de este incremento. El cultivo de estas células en presencia de 0,5 mM metil-isobutilxantina (MIX) incrementó la cantidad de ácido hialurónico liberado al medio de 7,22 $\pm$ 0,68 hasta 19,94 $\pm$ 1,63 nmoles disacárido/48h/well. Los proteoglicanos aumentaron de 0,69 $\pm$ 0,13 a 1,69 $\pm$ 0,24 nmoles disac./48h/well. La dexametasona en concentración de 10⁻⁷ M inhibió la producción de hialuronato (3,03 $\pm$ 0,26 nmoles disacárido/48h/well), mientras que tuvo un efecto positivo sobre la producción de proteoglicanos (1,00 $\pm$ 0,10 nmoles disac./48h/well. La insulina (10 μ g/ml) llevó la producción de

proteoglicanos a $1,80 \pm 0,41$ nmoles disac./48h/well y la de hialuronato a $19,31 \pm 2,91$ nmoles disac./48h/well. La dexametasona inhibió el estímulo de MIX e insulina en la producción de hialuronato sin modificar la de proteoglicanos totales. Utilizando «primers» sintetizados según la secuencia conocida para un proteoglicano similar de células endoteliales de ratón, encontramos porciones homólogas a los sitios de unión a ácido hialurónico. El AMPc y la insulina parecerían regular la síntesis de estos glicosaminoglicanos en 3T3-L1.

278. Actividad de adenosina deaminasa (ADA) y purina nucleósido fosforilasa (PNP) en tino de ratas co depleción proteica al destete. MS Feliu, NH Slobodianik.

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

Se ha demostrado que la malnutrición proteica al destete produce efectos deletéreos en el tino. En este trabajo se analizan las consecuencias provocadas por los distintos grados de depleción proteica sobre la actividad de las enzimas ADA y PNP en tino. Ratas Wistar recibieron a partir del destete dieta libre de proteína hasta pérdida del 15% (LP15), 20% (LP20), 25% (LP25) del peso inicial, reflejando cuadros de desnutrición leve, moderada y severa, respectivamente. Como controles se utilizaron ratas de igual edad que recibieron dieta stock desde el destete (C15, C20, C25). Los animales fueron sacrificados, se extrajo y pesó el tino (Pt) (mg), determinándose la actividad de las enzimas ADA y PNP (mmol ácido úrico/P) ($P = Pt/P^{0.75}$ corporal (g)). Los resultados obtenidos son: ADA: LP15: $17.5 \pm 4.1^*$, C15: 10.5 ± 2.9 ; LP20: $15.7 \pm 4.5^*$, C20: 9.1 ± 3.0 ; LP25: $17.0 \pm 2.6^*$, C25: 9.1 ± 3.0 . PNP: LP15: $7.1 \pm 0.8^*$, C15: 3.7 ± 0.9 ; LP20: $10.3 \pm 4.1^*$, C20: 4.1 ± 1.3 ; LP25: $11.5 \pm 4.2^*$, C25: 3.9 ± 1.0 (* $p < 0.01$ con respecto a su control). Los resultados sugieren que la malnutrición proteica al destete aumenta la actividad de las enzimas ADA y PNP, siendo el aumento independiente del grado de malnutrición alcanzado. (UBA, FA-021).

279. Estado nutricional con respecto a vitamina B2, en un grupo de adultos de Buenos Aires, antes y después de la suplementación. A Weisstaub, ME Río y ML de Portela.

Cátedra de Nutrición, Flad. de Farmacia y Bioquímica (UBA). Junín 956 (1113), Buenos Aires.

Se evaluó el estado nutricional con respecto a vit. B2 en 61 mujeres y 15 varones, clínicamente sanos, universitarios de la UBA, que no tomaban suplementos vitamínicos; edad (años): mujeres: 28.5 ± 7.5 ; varones: 26.5 ± 4.0 ; peso corporal promedio, Kg.: mujeres: 55.6 ± 6.7 ; varones: 70.4 ± 7.4 . Se calculó la ingesta de B2 (IB2) mediante una encuesta dietética de 7 días y un programa de computación (NUTRI-VAN, UNLU). Se extrajo sangre en ayunas, determinando el CA-GRE: coeficiente de actividad de la Glutación Reductasa Eritrocitaria (EC1.6.4.2) (grado de estimulación, por agregado de FAD «in vitro», en un hemolizado de glóbulos rojos).

Las IB2 fueron, mg/día: mujeres: 1.19 ± 0.44 (0.62-2.57) y varones: 1.65 ± 0.74 (0.69-3.27). Las IB2 fueron inferiores a las recomendadas (NRC, 1989, mg/día: mujeres: 1.3 y varones: 1.7) en 75.4 % de mujeres y 53.3 % de varones; presentaron deficiencia bioquímica (CA-GRE > 1,30): mujeres: 26.2 %; varones: 26.7 %; estos casos normalizaron el CA-GRE, luego de administrar 5mg/día de Vit. B2, durante una semana. Estos datos indican que la deficiencia bioquímica, en la población estudiada es de menor incidencia que la reflejada por los datos de ingesta diaria.

280. Relación entre anemia ferropénica e ingesta de hierro, en un grupo de gestantes del gran Buenos Aires. S Langini*, L López#, M García#, S Giraldez#, CR Ortega Soler# y ML Portela*.

*# Servicio de Obstetricia Hosp. Paroissien (La Matanza) y *Cátedra de Nutrición, Flad. Farmacia y Bioquímica (UBA).- Junín 956 (1113) Buenos Aires.*

Se evaluó el estado nutricional mediante el registro de la ingesta de Fe (IFe) y una batería de indicadores bioquímicos (IB). Se estudiaron 113 gestantes, clínicamente sanas (edad: 24.8 ± 6.1 años; edad gestacional 16.9 ± 3.8 semanas) asistidas en el Htal. D. Paroissien. Las IFe se calcularon por recordatorio de 24 hrs. a partir de Tablas de Composición Alemanas y del INCAP. En sangre entera se determinó: Hematocrito, Hemoglobina (Hb) (Cianometahb), Protoporfirina Eritrocitaria (PE) (s/ Piomelli) y en suero: ferritina (FERR) (Elisa). La IFe ($X \pm SD$) (mg/día) fue: 10.8 ± 4.6 , rango: 2.5 - 26.3; el % de casos con IB inadecuados fue: Hb < 11.0 g/dL: 5.5; PE > 70 ug/dL eritrocitos: 6.5; FERR < 12 ng/mL: 6.2; FERR < 50 ng/mL: 60%. Estos resultados evidencian que, las IFe son < 20mg/d, en el 96.4% de los casos, sin embargo fue baja la incidencia de anemia (5.5%) y 40% de las gestantes presentaron depósitos adecuados (> 500 mg = FERR > 50 ng/mL). Por ello, en estos casos no sería aconsejable administrar suplementos de Fe, con objeto de evitar los efectos del exceso de éste, durante el embarazo. Financiado por UBA FA 086.

281. Estudio del estrés oxidativo en pacientes con hiperlipemia. EM Clement, R Abaurre, E Maneschi, H Molina, M Corvalán, M Abud, S Maggio.

Cátedras de Clínica Médica II y Química Biológica, Hospital Italiano, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo.

Los radicales libres del oxígeno (ROL) lesionan los constituyentes de las membranas celulares. También se ha demostrado que las lipoproteínas oxidadas aumentan su poder aterogénico y la producción de ROL por las células de la pared arterial. El objetivo de este trabajo fue estudiar la actividad oxidativa en los distintos tipos de hiperlipemias (HLP). Se estudiaron 16 pacientes, 10 hombres y edades entre 30 y 64 años, con distintos tipos de HLP (hipertrigliceridemia 1, hipercolesterolemia 3, mixta 10 y HDL-colesterol bajo 2). Se lo comparó con un grupo control de 30 sujetos, apareado por sexo, edad

y peso. Se determinaron, en sangre periférica, como índice de estrés oxidativo: xantino oxidasa (XO), malonildialdehído (MDA), superóxido dismutasa (SOD) y vitamina C (VC). Se encontró un aumento significativo en XO ($24,7 \pm 3,3$ vs $5,3 \pm 0,7$ UI/l, $p < 0,0005$), en MDA ($1,93 \pm 0,33$ vs $0,5 \pm 0,06$ $\mu\text{mol/l}$, $p < 0,0005$) y en SOD ($38,7 \pm 4,6$ vs $27,7 \pm 2,7$ UF, $p < 0,0005$) y una disminución significativa en VC ($0,5 \pm 0,16$ vs $0,78 \pm 0,06$ mg/dl, $p < 0,0005$). Se destaca el aumento de la actividad oxidativa en la HLP.

INMUNOLOGIA II

282. Cambios asociados a la edad de las poblaciones CD4+ en el bazo y en los tejidos linfoides asociados al intestino en ratas. J FI y E Massouh.

Lab. Inmunquímica. FCEyN. Universidad de Buenos Aires.

Se estudió por citometría de flujo en ratas Wistar el porcentaje de las poblaciones CD4+ en el bazo y en los tejidos linfoides asociados al intestino (placas de Peyer y ganglio mesentérico). En bazo se observó un incremento en el porcentaje de la población CD4+ desde el destete hasta los 90 días ($10,1 \pm 0,5$ a $43,2 \pm 6,4$), permaneciendo luego constante hasta el año. Luego se observó una declinación llegando a los 2 años al $31,85 \pm 1,43$. La declinación afectó en mayor proporción a la subpoblaciones CD45RC+ (virgenes o inflamatorias) ($53,4 \pm 2,4$ a los 90 días y $42,88 \pm 3,9$ % del total de CD4 a los 2 años). En las PP también se observó un incremento en la población CD4+ a partir del destete hasta los 60 días ($7,55 \pm 1,5$ hasta $26,35 \pm 2,49$), permaneciendo luego constante hasta los 2 años. La subpoblación CD45RC+ se mantuvo constante desde el día 28 hasta los 2 años ($24,65 \pm 0,9$ y $24 \pm 0,79$). En el GM la población CD4+ se mantuvo constante desde el destete hasta los 2 años ($48,26 \pm 1,2$ % y $44,2 \pm 4,5$ %), observándose en las dos semanas siguientes al destete un incremento en la población CD45RC+ (del 39% al 59 % del total de CD4+), manteniéndose luego constante. En todos los órganos la población CD4+Thy-1+ disminuyó desde el destete, (un $39,2 \pm 3,39$ % en PP a los 21 días a un $10 \pm 2,4$ a los 2 años). Estos resultados indican por un lado, que durante las primeras dos semanas post destete ocurre un proceso acelerado de maduración de las poblaciones CD4+, por otro lado que el envejecimiento produce una disminución de células inmunocompetentes en el bazo pero no en los tejidos linfoides asociados al intestino posiblemente debido a la constante estimulación antigénica que allí sucede.

283. Efecto inmunomodulador de fluoxetina (FLU) sobre la actividad proliferativa de linfocitos T murinos (LT). V Ayelli Edgar, G Cremaschi, AM Genaro, E Borda, L Sterin-Borda.

CEFYO-CONICET. Buenos Aires.

Recientemente fue descripto que la FLU, antidepresivo de segunda generación, es capaz de inhibir la proliferación linfocitaria sin conocerse su mecanismo de acción. En este trabajo estudiamos la actividad de la FLU sobre la proliferación de LT estimulados con concanavalina A (ConA) medida por incorporación de timidina tritiada. Comprobamos que la FLU 10^{-7} M estimuló la proliferación celular al día 1 de cultivo (índice de estimulación (IE) ConA = $7,9 \pm 1,2$; ConA+FLU (10^{-7} M) = $54,4 \pm 5,7$; $n = 7$, $*p < 0,01$). En el pico de respuesta proliferativa obtuvimos sólo respuesta inhibitoria con dosis superiores a 10^{-6} M (IE ConA = $150,8 \pm 12,7$; ConA+FLU (10^{-6} M) = $81,8 \pm 5,1$; ConA+FLU (10^{-5} M) = $6,3 \pm 0,1$; $n = 7$, $*p < 0,01$). El PMA (activador de proteína quinasa C -PKC-) potenció los efectos estimulantes de FLU, obteniéndose valores similares a los inducidos por la asociación de PMA más un ionóforo de calcio, el A23187. Además, el PMA revirtió parcialmente los efectos inhibitorios de FLU. El A23187 anuló la respuesta estimulante de FLU. Estos resultados indicarían que la FLU podría ejercer un papel inmunomodulador de la actividad LT dependiente de la dosis y del momento del ciclo proliferativo celular en los que participaría la actividad de PKC y los flujos iónicos de membrana.

284. Expresión de receptores de IGF-1 (IGF-1 R) en células Jurkat. R Schillaci, MG Brocardo, A Roldán.

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires.

Hemos demostrado en linfocitos periféricos humanos estimulados *in vitro* que el IGF-1 coopera con la IL-2 en la expresión de la cadena α del receptor de IL-2 (IL-2R α). Para estudiar los mecanismos moleculares del IGF-1 en linfocitos T estimulados se eligió la línea de linfocitos T humanos Jurkat, que estimulan sintetizan IL-2 y su receptor. Primero se estudió la viabilidad, por coloración con azul trypan, de 1×10^6 cel/ml controles y estimuladas con 10 ng/ml PMA y 100 ng/ml ionóforo A23187 a las 24 hs de cultivo en distintos medios sin suero fetal bovino (SFB), para evitar la presencia del IGF-1. RESULTADOS ($\times 10^6$ cel/ml): RPMI 1640 5 % SFB controles, $1,20 \pm 0,09$; estimuladas $0,79 \pm 0,04$. RPMI sin SFB controles, $1,07 \pm 0,07$; estimuladas $0,27 \pm 0,02$. Dulbecco's: Ham F12 (sin SFB) controles, $0,88 \pm 0,11$; estimuladas $0,47 \pm 0,05$. Lo que señala a este último, como el más adecuado. Posteriormente, se determinó la presencia de IL-2R α e IGF-1R por citometría de flujo, a través de la marcación con anticuerpos fluorescentes de células cultivadas en RPMI 5% SFB. Sin estimular 27,7 % de las células expresaron IGF-1R y ninguna IL-2R α , mientras que estimuladas 51,0 % fueron IL-2R α positivas y el IGF-1R disminuyó a 9,7 %. La regulación negativa del IGF-1R en células Jurkat estimuladas sugiere un rol activo del IGF-1 en los mecanismos de transformación.