

## Resúmenes de las Comunicaciones

## Hematología

- 1. Control del tamaño de los multímeros del factor von Willebrand (vWF) por inmunoprecipitación (IP) con anticuerpos policlonales anti-Fibronectina (a-Fn) y a-C1q.** AC Kempfer, CE Farías, GA Carballo MR Silaf, MA Lazzari.

Academia Nacional de Medicina. CONICET. Buenos Aires.

Hemos encontrado que la exposición del vWF plasmático a alta fuerza de cizallamiento provoca la pérdida de los multímeros grandes (actividad). La actividad es inhibida por la presencia de a-Fn. La Fn experimenta degradación proteolítica espontánea y presenta propiedades latentes de fibronectinasa, gelatinasa, laminasa y colagenasa. El dominio de enlace a la gelatina de la Fn se enlaza al dominio del colágeno del C1q. La interacción entre Fn-C1q puede aumentar la desaparición de inmunocomplejos u otras partículas in vivo. La proteína sero amiloide (SAP), se une a C1q y a Fn. En este trabajo sugerimos que la actividad también es inhibida por la presencia de a-C1q. De la misma manera que el tratamiento por IP de plasma citratado con a-Fn, con a-C1q se bloquea completamente la actividad, inducida por alta fuerza de cizallamiento. La inmunoelectroforesis de los plasmas depletados indica que el plasma con 0% de C1q tiene 100% de Fn, mientras que el plasma con 0% de Fn tiene 12% de C1q. La separación del complejo antígenos-a-Fn, por cromatografía, confirma la presencia de C1q en el Vo. Anti: C3, C4, C5, C6, C7, C8, C4BP, PCR y especialmente el SAP no estarían involucrados. Al depletar el plasma por immunoabsorción, con bloqueo previo al agregado del plasma, con a-Fn y a-C1q la actividad permaneció en el plasma, de igual manera que al depletar los antígenos por inmovilización en BrCN-Sepharose 4B. Consideramos que la Fn y el C1q no son las sustancias con actividad; sus subproductos ó proteasas relacionadas no podrían descartarse.

- 2. Niveles plasmáticos de factores de crecimiento en pacientes con trombocitemia esencial.** Rosana F. Marta, Patricia Vasallú, Laura I. Kornblith, Felisa C. Molinas.

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

La trombocitemia esencial (TE) es un desorden mieloproliferativo crónico de origen clonal caracterizado por aumento de la proliferación de megacariocitos en médula ósea. El diagnóstico de la TE se realiza por exclusión de otros síndromes mieloproliferativos de acuerdo a criterios establecidos para esta enfermedad por el Grupo de Estudio de la Policitemia Vera. Para investigar si existe una expresión periférica de la desregulación de factores de crecimiento relacionados a la línea megacariocítica se estudiaron 40 pacientes con TE a los que se les determinó los niveles plasmáticos de interleuquina 6 (IL-6), receptor soluble de

interleuquina 6 (IL-6sR), interleuquina 3 (IL-3), interleuquina 11 (IL-11), factor estimulante de colonias granulocítico (G-CSF), factor estimulante de colonias granulocito-macrosfágico (GM-CSF), factor de células progenitoras (SCF) y trombopoietina (Tpo). Estas determinaciones se realizaron en muestras de sangre obtenida cuando los pacientes se encontraban sin tratamiento alguno y se utilizaron kits de ELISA tipo sandwich (R&D). Presentaron niveles aumentados de IL-6sR, 16/31 pacientes, 41 pg/ml (16-64.8) (mediana y rango) (VN 15-40); de IL-3, 6/30, 7.4 pg/ml (7.4-187) (VN <31); de Tpo, 4/32, 32 pg/ml (5.3-85) (VN <62.5) aumento de IL-11 se encontró en 1/29 pacientes y de SCF en 3/2. Los niveles de IL-6, G-CSF y GM-CSF se encontraron dentro de límites normales en todos los pacientes evaluados (33, 31 y 32 respectivamente). Estos resultados muestran aumento de 3 citoquinas que regulan la megacariocitopoyesis, IL-3, SCF y Tpo en algunos pacientes con TE así como el aumento de IL-6sR en el 50% de los mismos.

- 3. Hibridización in situ con fluorescencia (FISH) en leucemia linfocítica crónica.** Irma Slavutsky, Isabel Giere, Roxana Cerretini, Estela Pedrazzini, Marcela Sarmiento, G. Arrosagaray, Raquel Bengió.

Acad. Nac de Med., Fac. Cs Exac., UNLP, Centro Nac. de Genét Médica.

La LLC se caracteriza por presentar un bajo índice mitótico, observándose alrededor de un 50% de casos con cariotipos normales. La trisomía 12 es la anomalía numérica más frecuente. En este trabajo se presenta el estudio con técnica de FISH, utilizando la sonda del ADN α-satélite del cromosoma 12 (ONCOR), en 34 pacientes con LLC: 13 con cariotipos normales (CN), 8 con anomalías clonales (AC) estructurales y/o numéricas que no incluían al cromosoma 12 y 13 sin desarrollo citogenético. En todos ellos se efectuó cultivo de linfocitos de sangre periférica en medio F-10 suplementado con 15% de suero fetal bovino y estimulados con fitohemaglutinina y pokeweed mitogen, a 37°C durante 72 hs. El análisis de FISH se realizó evaluando al menos 400 núcleos por paciente, determinando el porcentaje de: 0, I, II, III y IV señales positivas. Asimismo, se estudiaron 4 cultivos normales utilizados como control. El análisis con FISH mostró trisomía 12 en: 4 (31%) de los casos con CN, en 2 (25%) de los pacientes con AC y en 2 (15%) de los casos sin desarrollo citogenético. Estos resultados muestran la importancia de complementar con FISH el estudio citogenético de los pacientes con LLC, a fin de detectar anomalías clonales de baja expresión en núcleos interfásicos, las que de otra manera pasarían totalmente desapercibidas.

- 4. Presencia de Factor Von Willebrand (vWF) en PMN y durante el contacto con plaquetas.** N Maugeri<sup>(1)</sup>, M Nanni<sup>(1)</sup>, M Narbaitz<sup>(2)</sup>, MA Lazzari<sup>(1)</sup>.

(1) Depto Hemost Tromb. y (2) Div Patolo. Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires.

Hemos detectado la presencia de vWF formando parte de los agregados de plaquetas y PMN. A fin de determinar si ésta observación se debía a la presencia de vWF plasmático, se realizaron experimentos con PMN aislados de la sangre y lavados. Por citometría se determinó que la fluorescencia media para vWF fue de  $812 \pm 52$ , marcándose más del 70% de los PMN, y el negativo (control de isótipo para vWF) marcó menos del 1% de los PMN. Se realizó inmunohistoquímica con avidina-biotina o con fosfatasa alcalina antifosfatasa para el anticuerpo políclonal contra vWF. Así, se observó una distribución homogénea del vWF sobre todo el PMN, mientras que en los agregados mixtos, la zona de vWF se circunscribe a la zona de contacto con plaquetas. Como ya se ha descripto que el contacto con plaquetas actúa como un estímulo para los leucocitos, induciendo la polarización de receptores sobre su superficie, hemos analizado muestras de PMN estimuladas con FMLP, donde nuevamente se observó una polarización en la distribución de vWF sobre la superficie del leucocito. En conclusión: los PMN aislados y lavados presentan sobre su superficie vWF, el cual adquiere una distribución polar durante la activación leucocitaria, actuando como puente para el contacto con plaquetas.

**5. Hipofibrinolisis asociada a trombosis o pérdidas fetales.** A. Blanco, C. Varela, J. Salviú, S. Meschengieser, C. Fondevila, M. Lazzari.

Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires.

La hipofibrinolisis aumentaría la propensión trombótica; sin embargo, es contradictorio el riesgo relativo de trombosis y se discute si es causa o consecuencia de modificaciones fisiopatológicas. Hemos estudiado 64 pacientes con trombofilia (T) (58% con trombosis venosas) y 20 mujeres con abortos o pérdidas fetales a repetición (A). En el 24% de las trombofilias y en el 30% de las mujeres con complicaciones obstétricas hallamos una alteración exclusiva de la fibrinolisis. Siendo el aumento de PAI-1 Ag basal (T:45%, A:38%) y la falta de respuesta a la isquemia ( $\Delta E_u$  T:46%, A:45%;  $\Delta tPA$  T:37%, A:36%) las alteraciones más frecuentes. En un alto porcentaje de los individuos analizados (T:60%, A:50%) la hipofibrinolisis estaba asociada a otro/s defecto/s de la hemostasia (LA/aCA:43%,  $\downarrow PC:16\%$ ,  $\downarrow PS:26\%$ , APCR:22%,  $\downarrow ATIII:3\%$  o  $\downarrow Fg:8\%$ ). No observamos diferencias significativas ( $p>0.5$ ) para las alteraciones halladas entre los pacientes con trombosis venosas o arteriales, ni entre los individuos con trombofilia y las mujeres con complicaciones obstétricas. Si bien no es posible afirmar que la hipofibrinolisis es la causa de las complicaciones trombóticas, es llamativa la alta prevalencia de la misma en los grupos estudiados.

**6. Detección de anticuerpos anti- $\beta_2$  Glicoproteína I en sueros de pacientes con o sin anticuerpos anti-cardiolipinas.** Angeles Gargiulo, L. Suárez, J. Sarano, A. Casellas.

Sección Inmunología. Instituto de Investigaciones Médicas "Alfredo Lanari". UBA, Buenos Aires.

El objetivo de este trabajo fue evaluar anticuerpos anti- $\beta_2$  Glicoproteína I  $\beta_2$ -a-(2GPI) en pacientes con sospecha de anticuerpos anti-cardiolipinas (aCL) y su asociación con la clínica. Se estudiaron 100 sueros (68 LES, 16 de otras enfermedades autoinmunes, 4 SAP y 12 normales). Los aCL se detectaron por ELISA, y los a- $\beta_2$ GPI por ELISA usando placas irradiadas. El antígeno fue  $\beta_2$ GPI purificada. Fueron positivos si el  $\Delta$  de DO a 492 nm era  $> 0.055$  (valor de la  $x + 3SD$  de normales). Presenta-

ron aCL+ 66/88 sueros y a- $\beta_2$ GPI 20/88. Fueron aCL+ 2/12 normales y a- $\beta_2$ GPI 1/12. No se encontró correlación entre a- $\beta_2$ GPI+ e isótipos de aCL, si correlacionaron los altos títulos de aCL de cualquier isótipo y la presencia de a- $\beta_2$ GPI (de 14 a- $\beta_2$ GPI+, 13 son aCL+ y de 52 a- $\beta_2$ GPI-), 29 son aCL+)  $p<0.05$  (T. Fisher). No presentaron manifestaciones asociadas a la presencia de estos anticuerpos 6/20 sueros a- $\beta_2$ GPI+ con aCL-. Los 12 pacientes con trombosis (3 SAP, 9 LES) tenían aCL+ en títulos altos y 4 fueron a- $\beta_2$ GPI+. Los a- $\beta_2$ GPI se asocian a títulos altos de aCL y su presencia aislada parecería no tener valor predictivo de trombosis, por el contrario, altos títulos de aCL con a- $\beta_2$ GPI podrían detectar sí, un grupo de pacientes con mayor riesgo de eventos trombóticos.

**7. Efecto de la intoxicación crónica de Cadmio sobre parámetros hemáticos de rata.** Ethel Larregle, S. Varas, R. Hasuoka\* y M.S. Giménez.

Lab. de Qca Biológica. UNSL. \* PRSL. San Luis.

El cadmio es un metal altamente tóxico y un importante contaminante ambiental. En humanos la exposición crónica a Cd resulta en la enfermedad de Itai-itai, caracterizada por osteomalacia y desorden renal tubular que conduce a anemia. Anteriormente mostramos que ratas expuestas a intoxicación crónica con Cd durante 2 meses desarrollan histopatología renal, con importante daño tubular. El objetivo de este trabajo fue determinar si la exposición crónica de Cd produce alteraciones de los parámetros hemáticos. Se utilizaron ratas Wistar machos, en dos grupos: 2 y 6 meses de intoxicación respectivamente que recibieron Cd (15ppm) como CdCl<sub>2</sub> en el agua de bebida. Controles bebieron agua sin Cd. Se registró el peso inicial, final y el consumo de agua diario. Luego del sacrificio, se colectó la sangre en EDTA 5%. Se realizó el recuento de leucocitos, eritrocitos (RBC) y la determinación de Hb, Hto, VCM, HCM, MCHC y RDW (Cell-Dyn 1600, Abbott) y protoporfirinas libres eritrocitarias (PPE), método de Piomelli, en un espectrofluorómetro Shimadzu. Resultados: término medio  $\pm$  error, significancia Test de Student para  $p<0.05$ . En ratas tratadas respecto a los controles: en 2 meses se observó leucocitosis con linfocitosis ( $p<0.001$ ), sin variación en el resto de los parámetros; en 6 meses, VCM  $51.3 \pm 5.3$  vs  $45.2 \pm 2.7$  ( $p<0.02$ ), MCHC  $37.9 \pm 1.9$  vs  $41.3 \pm 0.6$  ( $p<0.03$ ) y PPE  $146.9 \pm 43.5$  vs  $80.1 \pm 43.5$  ( $p<0.04$ ). RBC ligeramente disminuido. La intoxicación con cadmio modifica parámetros hemáticos, afectando en particular, a los dos meses a la serie blanca y con exposición más prolongada a la serie roja.

**8. Detección de la unión del Factor von Willebrand (vWF) al colágeno y el vWF:Ag por citometría de flujo (CF).** AC Kempfer, CE Farías, MR Silaf, GA Carballo, AI Woods, MA Lazzari.

Academia Nacional de Medicina. CONICET. Buenos Aires.

El colágeno se une preferentemente a los multímeros grandes del vWF, que participan trascendentamente en la adhesión plaquetaria. En la variante 2 de la vWD existe disminución de dichos multímeros. Hemos desarrollado un nuevo método para detectar el enlace del vWF al colágeno (CBA\*) por CF. Se revisten microesferas de poliestireno con colágeno, se incuban las distintas muestras plasmáticas, el vWF se detecta con anti-vWF y con anti IgG fluorescente. Paralelamente se determinó el vWF:Ag\* por CF, cubriendo las microesferas con anti-vWF, el vWF:Ag por

inmunolectroforesis y el cofactor de Ristocetina (Rcof). En la tabla vemos que:

muestras	vWF:Ag, U/dL	vWF:Ag*, U/dL	CBA*, U/dL	RCoF, U/dL	vWF:Ag*/CBA*
normal mediana (n=27) rango	103 53-220	102 55-223	105 54-184	97 58-195	0.9 0.5-1.4
vWD1 mediana (n=7) rango	32 19-47	33 13-49	28 17-48	28 11-41	1.1 0.8-1.3
vWD 2A (n=1)	56	55	4	13	13.7
vWD 2N (n=2)	75 45	78 40	87 31	76 56	0.9 1.3
vWD 3 (n=1)	nd	nd	nd	nd	-
hemofilia (n=1)	105	99	94	100	1.1

no hubo diferencias significativas entre todas las variables dosadas para normales y vWD tipo I (t-test). En los otros pacientes, hubo concordancia entre los parámetros que detectan: todos los multimeros y los que evalúan sólo los multímeros grandes (CBA\*, Rcof). La relación entre las variables obtenidas por CF, nos indica la alteración del vWD 2A. Este método resultó más preciso, reproducible que el CBA por enzimoinmunoensayo y no es tóxico.

**9. Respuesta asociada a la administración de G-CSF en episodios neutropénicos en pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA).** Victoria Da Cunha, Marla S. Podrez Yaniz, Luz Piñero, Carolina Montoreano y Pablo Gisone.

Departamento de Pediatría. Hospital de Clínicas José de San Martín. UBA, Buenos Aires.

La eficacia de la administración de G-CSF en episodios de neutropenia en niños con LLA, es controvertido. Con el objetivo de testear si puede resultar beneficiosa la administración de G-CSF en términos de evolución clínica-hematológica, se incluyeron en este estudio 48 casos encuadrados en los siguientes criterios de inclusión:-Diagnóstico de LLA; neutropenia menor o igual a 1000 fagocitos; menores de 18 años y mayores de 1 año, cumpliendo protocolo de quimioterapia LLA-90:BFM/GATLA. Se excluyeron los pacientes neutropénicos al alta. Se trata de un estudio tipo caso control considerándose los siguientes puntos finales: duración de neutropenia; frecuencia de complicaciones infecciosas y no infecciosas; duración de hospitalización; días de antibioticoterapia. Resultados: días de neutropenia sin G-CSF: x 17,1 dx DS ± 7. Días de neutropenia con G-CSF: x 12,3 d (DS ± 9). Días de antibioticoterapia con G-CSF: 14,4 d (DS ± 8). Días de antibioticoterapia sin G-CSF: 13,6 d (DS ± 10,2). Días de internación con G-CSF: 44,9 d (DS ± 21,2). Días de internación sin G-CSF: 38,8 d (DS ± 15,2). Podría concluirse que en nuestra casuística el uso de G-CSF no parece modificar la evolución clínica hematológica de estos pacientes..

**10. El aluminio interfiere la captación de hierro por células eritroides.** Gladys Pérez, Graciela Garbossa, Beatriz Sassetti, Cecilia Di Risio, Alcira Nesse.

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

La acumulación de aluminio (Al) en el organismo ha sido

asociada con anemia. Previamente hemos demostrado que el Al produce inhibición del desarrollo de CFU-E *in vivo e in vitro*, dependiente de la disponibilidad de sitios en la transferrina (Tf). El presente trabajo fue diseñado para determinar si Al y Fe comparten el mecanismo de captación en la línea eritroleucémica K562. Para inducir su diferenciación, las células fueron estimuladas con hemina durante 3 días y se determinó el porcentaje de hemoglobinización por reacción con bencidina. Para los ensayos de binding se empleó <sup>125</sup>I-Tf-Fe<sub>2</sub> y, como competidores Tf-Fe<sub>2</sub> y Tf-Al<sub>2</sub>. Estos se prepararon a partir de ApoTf y su saturación se evaluó por espectrofotometría a 470 y 240 nm, respectivamente. Los ensayos de diferenciación celular mostraron 30 (18-58) % de células hemoglobinizadas al ser cultivadas en presencia de Al vs. 75 (46-83) % en ausencia de Al. El Al no afectó la viabilidad celular (>90%). Las experiencias de saturación y de binding competitivo mostraron que el receptor de membrana para Tf (RTf) posee afinidad similar por Tf-Fe<sub>2</sub> ( $K_d = 1.7 \times 10^{-9}$  M) y por Tf-Al<sub>2</sub> ( $K_d = 1.4 \times 10^{-9}$  M). Los resultados indican que el Al actúa como un competidor por la unión del RTf con el ligando fisiológico Tf-Fe<sub>2</sub>. Esta podría ser una de las causas de la disminución de la síntesis de Hb en las células K562 al ser cultivadas en presencia del catión.

**11. Capacidad antioxidante total y lipoperóxidos plasmáticos en pacientes sometidos a transplante de médula ósea (TMO).** A. Enriquez<sup>(1)</sup>, D. Dubner<sup>(2)</sup>, P. Gisone<sup>(2)</sup>, S. Michelín<sup>(2)</sup>, M.R. Pérez<sup>(2)</sup>, A. Robinson<sup>(3)</sup>

(1) CAECE, (2) Autoridad Regulatoria Nuclear, (3) Hospital Naval Pedro Mallo, Buenos Aires.

La irradiación corporal total (ICT) terapéutica puede constituir un modelo útil de sobreexposición accidental. Ha sido demostrado que tal terapia condicionante crea un alto grado de stress oxidativo. El propósito de este trabajo es examinar el comportamiento de los lipoperóxidos (LP) y la capacidad antioxidante total (TRAP) en plasma y su relación con el curso evolutivo en pacientes con aplasia medular inducida por radiación y/o radiomiméticos. En 3 pacientes sometidos a quimioterapia (QT) y 8 sometidos a QT + ICT se evaluó el nivel de LP (uM) y TRAP (mM) en muestras secuenciales de plasma obtenidas durante el condicionamiento (días -9 a 0) y post TMO hasta el alta del paciente. Durante el condicionamiento se observó un aumento en el nivel de LP (día -9: 1.22 rango 0.31-4.28, día 0: 1.87 rango 0.23-7.97 p<0.05) y una disminución en los valores de TRAP (día -9: 1.36 rango 0.78-1.66, día 0: 1.26 rango 0.85-1.60 p<0.05). En los pacientes que mostraron una evolución favorable (engraftment dentro de las 3 semanas post-TMO) se observó una disminución en los niveles de LP a partir del día 7 post TMO (0.92 rango 0.32-1.55 p<0.05) a diferencia de aquellos con evolución desfavorable (engraftment tardío o muerte: 2.26 rango 0.55-5.45). El nivel de TRAP recuperó los valores basales a partir del día 7 post TMO en ambos grupos. Los resultados sugieren que el nivel de LP plasmáticos podría constituir un marcador pronóstico aplicable en casos de sobreexposición accidental.

**12. Acción de la troxerutina sobre los parámetros hemorreológicos en la línea de ratas IIIMe/Fmβ.** Hernández, G. - Gayol M.C. - Raspa, M. - Cátedra de Física Biológica.

\*Cátedra de Biología. Facultad de Cs. Médicas. Universidad Nacional de Rosario, Rosario.

Diabetes, obesidad e hipertensión son patologías frecuentes de gran interés médico, con componentes hemorreológicos. La línea de ratas IIIMe/Fm $\beta$  de la Fac. de Cs. Médicas reúne las tres patologías determinadas genéticamente, constituyendo un modelo de diabetes sin intervención de tóxicos. Se investigó el efecto de la troxerutina (60mg/día/100gr de peso, intraperitoneal), utilizada en la insuficiencia venosa, sobre variables hemorreológicas en ratas IIIMe/Fm $\beta$  de 200 días (control, n=5, tratadas n=6). Se determinó: Hematocrito (Hct), contejo glóbulos rojos (GR), concentración de Hemoglobina (Hb), viscosidad sanguínea a Hct nativo ( $\eta_n$ ) y viscosidad plasmática ( $\eta_p$ ). Las mediciones de  $\eta$  se realizaron en viscosímetro Brookfield a 37 °C ( $\eta_n$  a velocidad de cizallamiento ( $\gamma$ ): 23, 46, 115 y 230 s $^{-1}$ ). Los resultados (expresados como mediana, rango) muestran diferencias significativas entre controles y tratados en: Hct, GR, Hb y volumen globular; pero no en  $\eta_n$  (5.38, 0.45; 6.5, 2.6) ni en  $\eta_p$  (1.25, 0.2; 1.45, 0.4), mientras que la  $\eta_n$  relativa a Hct standard (45%), resulta significativamente diferente (7.7, 2.08; 5.16, 1.4, p<.05). La troxerutina favorecería la fluidez sanguínea modificando factores celulares responsables del comportamiento reológico (deformabilidad de los GR).

**13. Cambios hemorreológicos en mujeres menopáusicas.** M.I. Spengler, G. Goñi, G. Mengarelli, M. Rasia. Fac. de Cs. Médicas.

Cát. Biofísica. UNR, Rosario.

El objetivo de este trabajo fue la evaluación de los parámetros hemorreológicos en un grupo de mujeres menopáusicas y su comparación con los de un grupo de mujeres premenopáusicas (grupo control). Se determinaron viscosidad sanguínea ( $\eta_n$ ) y plasmática ( $\eta_p$ ) (con un viscosímetro cono-plato), índice de rigidez eritrocitaria (IR) (por filtración con membrana Nucleopore) y concentración de fibrinógeno plasmático ( $f_p$ ) (por método gravimétrico). Los resultados obtenidos demuestran que las  $\eta_n$  (mPs) de las mujeres menopáusicas, a velocidades fisiológicas, son mayores que las del grupo control ( $5.26 \pm 0.37$  vs  $4.74 \pm 0.34$  p<.05). Además, hemos podido comprobar en estas mujeres la modificación de factores determinantes de ese aumento de la  $\eta_n$ : encontramos una elevación de la  $\eta_p$  (mPs) respecto al grupo control ( $1.62 \pm 0.08$  vs  $1.50 \pm 0.06$  p<.05) que correlacionó ( $r=.456$ ; p<.001) con el aumento del  $f_p$  (mg%) ( $383 \pm 42$  vs  $270 \pm 38$ ; p<.05); y un aumento del IR respecto del grupo control ( $11.5 \pm 1.9$  vs  $8.78 \pm 1.5$ ; p<.05) que correlacionó con la  $\eta_n$  ( $r=.375$ ; p<.01) mostrando en ambos casos una posible relación causa-efecto. El aumento de la  $\eta_n$ , del IR y de la  $\eta_p$  pueden deteriorar la microcirculación y sumado a la mayor concentración de  $f_p$ , favorecer la formación de trombos. Podemos postular que en la menopausia hay factores hemorreológicos que pueden elevar el riesgo de enfermedad cardiovascular.

**14. Utilidad de un ensayo funcional basado en la unión del factor von Willebrand (vWF) al FVIII para clasificar pacientes con enfermedad de von Willebrand (vWD).** CE Farías, AC Kempfer, S Meschengieser, GA Carballo, MR Silaf, A Blanco, AI Woods, ML Lazzari.

Academia Nacional de Medicina. CONICET. Buenos Aires.

Se ha caracterizado un nueva vWD (tipo 2N), con distintas mutaciones en el dominio D $^1$ , según las cuales existe una disminuida

o nula afinidad del vWF por el FVIII. Esta característica nos ha permitido lograr el probable diagnóstico diferencial entre pacientes hemofílicos, exclusivamente vWD tipo 1 y vWD 2N. Se utilizó, un enzimoimmunoensayo según la técnica de Nishino con algunas modificaciones (anti-vWF DAKO, FVIII Kogenate, sustrato cromogénico Coamatic). Con previo dosaje de vWF:Ag, Recof, FVIII, se evaluó el enlace del vWF al FVIII (E) en 10 pacientes respecto a un pool de plasmas normales (n=27, considerado como 100%). En la tabla, todos los parámetros se expresan en U/dL y el rango de normalidad de los parámetros previos se da entre paréntesis. De los resultados obtenidos surge que son:

paciente	vWF:Ag (53-220)	Recof (58-195)	FVIII (50-150)	E	vWF:Ag/E
1	45	56	11	6	7.5
2	80	81	45	100	0.8
3	64	73	10	12	5.3
4	75	76	13	25	3.0
5	110	105	7	17	6.5
6	103	90	2	30	3.3
7	112	130	40	100	0.9
8	68	94	21	100	0.7
9	240	230	18	49	5.0
10 (madre de 3)	94	90	25	9	10.4

probables 2N todos los pacientes excepto 2, 7, 8. El paciente 1 sería vWD tipo 2N y tipo 1. El diagnóstico de los pacientes cuyo E sea mayor de 20 U/dL debe confirmarse por biología molecular.

**15. Acido δ-aminolevulínico dehidratasa (ALAD) y plombemia en *Bufo arenarum* inyectados con plomo.** Silvia Perí<sup>1</sup>, M. Arrieta<sup>2</sup>, K. Apartín<sup>3</sup>, C. Rosenberg<sup>1</sup>, N. Fink<sup>2</sup> y A. Salibián<sup>4</sup>.

1- Cát. Fisiología Animal, Fac. Cs. Nat. y Museo, 2- Cát. Hematología y 3- CIMA, Fac. Cs. Exactas, UNLP. 4- CIC, UNLu.\* Becaria de CIC

La alta toxicidad del plomo para la biota se debe a su facilidad para incorporarse a ella por distintas vías y bioconcentrarse. Se evaluó la ALAD como bioindicador de intoxicación en función de las concentraciones de plomo en sangre periférica. Ejemplares machos adultos (pc=120-140g) se aclimataron a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , 12D:12N por 5 días y, recibieron una única dosis de acetato de Pb (tratados) y de Na (controles). A la semana, las determinaciones fueron: ALAD (Método Standardizado Europeo modificado para *Bufo*) y plumbemia (EAA). Para las dosis de Pb (0,10,25,50,100 mg/Kg), la ALAD (U/L hematíes) y la plumbemia (mg/dL) - promedio ± ESM- (n) fueron:  $148.72 \pm 14.47$  y  $0.76 \pm 0.22$  (12);  $100.17 \pm 7.81$  y  $3.36 \pm 0.56$  (12);  $65.27 \pm 6.18$  y  $4.95 \pm 1.78$  (8);  $57.47 \pm 6.70$  y  $5.32 \pm 3.29$  (8);  $38.66 \pm 5.16$  y  $7.26 \pm 2.45$  (5). La comparación de datos de ALAD de controles y tratados mediante un test de t fué significativa ( $p < 0.05$ ) para todas las dosis empleadas. Asimismo, se concluye que, en el modelo empleado, la relación dosis-respuesta de la actividad de la ALAD en función de los niveles de plomo es inversa.

**16. Rol de las plaquetas en la activación leucocitaria en condiciones dinámicas de flujo.** N. Maugeri, M. Nanni, AC Kempfer, MA Lazzari.

Depto Hemost Thromb. Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires.

En estudios anteriores hemos observado cómo los cambios reológicos modulan la respuesta de los PMN. Nos propusimos analizar el rol de las plaquetas en el mismo sistema. PMN ( $5 \times 10^6 / mL$ ) solas o con plaquetas ( $10^6 / mL$ ) de individuos sanos ( $n=5$ ) fueron perfundidos por una tubuladura de sylastic a un shear stress ( $ss$ ) =  $6.6 \text{ dyn/cm}^2$ . Se determinó quimioluminiscencia (CL), CD11b, CD62P y formación de agregados mixtos. Las muestras fueron analizadas antes y después de la perfusión, con y sin estímulo de fMLP  $0.5 \mu M$ . Resultados: (media  $\pm$  SEM). La expresión de CD62P aumentó de 5 a 20% de 5000 plaquetas. En PMN, la CL inducida por fMLP aumento de  $28 \pm 7$  a  $53 \pm 8$  ( $p < 0.001$ ) mientras que en presencia de plaquetas los valores fueron de  $46 \pm 10$  a  $76 \pm 6^*$ . La expresión de CD11b inducida por fMLP fue incrementada desde  $276 \pm 69$  hasta  $441 \pm 70$  (0.05), mientras que en presencia de plaquetas descendió de  $250 \pm 38$  hasta  $462 \pm 39$  ( $p < 0.001$ ) después del ss. Así mismo, la formación de agregados mixtos de plaquetas y leucocitos (evaluada por citometría) se vió incrementada (6 ± 2% vs 35 ± 7%), en las muestras tratadas con fMLP fue desde 13 ± 5% a de 53 ± 3%. Los resultados sugieren que los PMN son más sensibles al estímulo quimiotáctico bajo cambios reológicos y principalmente en presencia de plaquetas. La relevancia funcional de nuestras observaciones se basa en el incremento evidente en la formación agregados mixtos durante los cambios reológicos.

**17. Efecto del bajo shear rate sobre la liberación de PAI-1 intraplaquetario; su inhibición con aspirina.** Al Woods, N Maugeri, AC Kempfer, MA Lazzari.

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

Analizamos el efecto del colágeno (Col) y la aspirina (ASA) en la liberación de PAI-1 intraplaquetario en un sistema de flujo. Plaquetas ( $3 \times 10^6 / mL$ ) lavadas (PL) y resuspendidas en Tyrode ( $Ca^{+2} 1mM$ , alb 3%), se perfundieron a un shear rate de  $200s^{-1}$  ( $2.2 \text{ dyn/cm}^2$ ). Las muestras ( $n=12$ ) se trataron con Col (0.25-10  $\mu g/mL$ ), y/o ASA (0.18  $\mu g/mL$ ). El PAI-1 (ng/ml) se midió en sobrenadante de PL, siendo el contenido total el obtenido en PL tratadas con triton. Resultados: PL sin perf.:  $23.2 \pm 8.4$  (11% del total); PL perfundidas: solas:  $22.2 \pm 5.8$  (11%); PL+Col 0.25  $\mu g/mL$ :  $26.5 \pm 10$  (13%); PL+ASA:  $23.7 \pm 8.5$  (12%); PL+ASA+Col 0.25  $\mu g/mL$ :  $27.5 \pm 7.5$  (13%); PL+Col 0.5  $\mu g/mL$ :  $45.7 \pm 20.4$  (22%); PL+ASA+Col 0.5  $\mu g/mL$ :  $26.3 \pm 8.6$  (13%); PL+Col 1  $\mu g/mL$ :  $71.6 \pm 34.3$  (35%); PL+ASA+Col 1  $\mu g/mL$ :  $38 \pm 12$  (19%); PL+Col 2  $\mu g/mL$ :  $90 \pm 34.6$  (44%); PL+ASA+Col 2  $\mu g/mL$ :  $44.5 \pm 12.4$  (22%); PL+Col 4  $\mu g/mL$ :  $114 \pm 45.4$  (56%); PL+ASA+Col 4  $\mu g/mL$ :  $65 \pm 21$  (32%); PL+Col 10  $\mu g/mL$ :  $158 \pm 66$  (77%); PL+ASA+Col 10  $\mu g/mL$ :  $85 \pm 34$  (42%); PL lisadas:  $204 \pm 43$  (100%). No hubo diferencia entre PL solas sin perf. y perf. con y sin ASA. La perfusión produce liberación de PAI-1 bajo la acción de un agonista que en el caso del Col el umbral es de 0.5  $\mu g/mL$  y que la respuesta depende de la concentración del mismo. Col 0.25  $\mu g/mL$  no produce liberación de PAI-1. ASA inhibe el 100% de la respuesta del Col 0.5  $\mu g/mL$ , el 84% en el caso del Col 1  $\mu g/mL$ ; el 62% para el Col 2  $\mu g/mL$ ; el 55% para el Col 4  $\mu g/mL$  y el 56% para el Col 10  $\mu g/mL$ . ASA es capaz de bloquear la liberación de Col a bajas dosis (0.5 y 1  $\mu g/mL$ ) mientras que su efecto disminuye marcadamente a altas concentraciones de Col, bajo condiciones de flujo.

**18. Neutralización del dRVVT mediante fosfolípidos comerciales.** A. Blanco, L. Gennari, M. Lazzari.

Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.

El tiempo con veneno de víbora Russell (dRVVT) es una prueba muy utilizada en la detección del inhibidor lúpico (LA); no debe corregir con plasma normal y debe ser neutralizado con fosfolípidos (ej.: lisado plaquetario), para corroborar la presencia del LA. Evaluamos la posibilidad de reemplazar el lisado plaquetario con un reactivo comercial para APTT (Thrombosil™). Analizamos plasmas LA<sup>-</sup> ( $n=13$ ) ( $7/13$  con dRVVT↑) y LA<sup>+</sup> ( $n=10$ ), realizando el dRVVT en plasma y en la mezcla P:N, con y sin el agregado de fosfolípidos, A: lisado plaquetario o B: Thrombosil™, ambos diluidos en tampón de Owren (1:50 y 1:150). Calculamos los cocientes P/N y los deltas para plaquetas ( $\Delta_A$ ) ( $LA^-: -0.03 \pm 0.04$ ;  $LA^+: 0.32 \pm 0.12$ ) y Thrombosil™ ( $\Delta_B$ ) ( $LA^-: 0.02 \pm 0.03$ ;  $LA^+: 0.20 \pm 0.10$ ), estableciendo los valores de corte ( $>X+2DS$ ) para  $\Delta_A$  ( $>0.10$ ) y  $\Delta_B$  ( $>0.13$ ). No observamos diferencias ( $p > 0.1$ ) entre los valores de  $\Delta_A$  y  $\Delta_B$  para LA<sup>-</sup> o LA<sup>+</sup>, la correlación entre  $\Delta_A$  y  $\Delta_B$  fue buena en ambos grupos ( $r: 0.87-0.90$ ); en cambio obtuvimos diferencias ( $p < 0.001$ ) entre LA<sup>-</sup> y LA<sup>+</sup>. La sensibilidad de  $\Delta_A$  fue mayor la de  $\Delta_B$  (45% vs. 100%), aunque con igual especificidad (92%). Los resultados se igualan al considerar los deltas de la mezcla P:N (sensibilidad 78%-80%; especificidad 100%). El lisado plaquetario podría ser reemplazado por Thrombosil™, siempre que se realice la neutralización sobre el plasma y la mezcla P:N.

**19. APTT automatizado modificado ( $A_A$ ) vs. manual ( $K_M$ ): sensibilidad y especificidad en déficit de factores (DF) o inhibidores.** A. Blanco, S. Grossi, M. Lazzari.

Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.

Los reactivos comerciales son menos sensibles (dependiendo de los fosfolípidos y/o del activador), pero la cefalina:caolín, no puede ser utilizada en sistemas ópticos. Hemos comparado el comportamiento del  $A_A$  (KoaguLab 60-S; Thrombosil™ diluido 1:3 en Owren), respecto del  $K_M$  (cefalina<sub>conejo</sub>:caolín<sub>ratón</sub>) en normales ( $n=192$ ), DF ( $n=127$ ) o presencia de inhibidores afVIII ( $n=22$ ) o lúpicos (LA) ( $n=79$ ). No hallamos diferencias ( $p > 0.1$ ) entre  $K_M$  y  $A_A$  en DF o afVIII, observándose buena correlación (0.90 y 0.86). En LA, los valores de  $K_M$  fueron mayores ( $78.5 \pm 3.9$  vs.  $67.9 \pm 3.8$ ;  $p=0.0554$ ) y en correlación con  $A_A$  ( $r=0.82$ ). Estableciendo como valor de corte  $A_A$ : 53 ( $>X2DS$ ) la sensibilidad fue DF: 49%, LA: 55% y afVIII: 100%; siendo la especificidad de 98%, 93% y 100% respectivamente. Si analizamos los LA con  $A_A < 53$ , observamos diferencias ( $p=0.0079$ ) entre  $K_M$  y  $A_A$  ( $59.0 \pm 1.7$ ;  $43.8 \pm 0.8$ ) y no correlación ( $r=-0.03$ ) entre ambos; en cambio, los  $A_A \geq 53$  no mostraron diferencias ( $96.1 \pm 7.3$ ;  $85.1 \pm 6.3$ ) y la correlación fue buena ( $r=0.79$ ). Al comparar  $A_A < 0 \geq 53$ , observamos diferencias para ambos  $K_M$  ( $p=0.0332$ ) y  $A_A$  ( $p=0.0154$ ) sugiriendo no sólo menor sensibilidad del  $A_A$ , sino tal vez indicando distintas subpoblaciones de LA.

**20. Detección específica de anticuerpos anti-factor VIII (afVIII) por ELISA.** A. Blanco, A. Kempfer,

C.Varela, L.Gennari, S.Grosso, M.Lazzari.

Dpto. Hemostasia y Trombosis. Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires.

Los hemofílicos pueden desarrollar afVIII y anticuerpos anti-fosfolípidos-proteínas (a-PLP:LA o aCA). El diagnóstico es complejo ya que los LA interfieren en la identificación de los afVIII. Hemos desarrollado un sistema de ELISA utilizando como antígeno fVIII<sub>recombinante</sub> libre de FL (<0,15μg/UfVIII), a fin de evitar falsos+ (a-PLP que se unan a los FL unidos al fVIII) o falsos- (afVIII que no reconozcan fVIII unido a FL). Inmovilizamos fVIII (bicarbonato 0,1M; pH:9,6), bloqueando con Imidazol 2M-NaCl 0,12M-Alb 5%, y revelamos la IgG unida, mediante algG<sub>humana</sub>-fosfatasa. El sistema fue capaz de detectar un monoclonal afVIII, revelado con algG<sub>ratón</sub> (control inespecífico: monoclonales a-GPIIIa y a-vWF). Analizamos: hemofílicos afVIII+ (3100-0,8UB/ml) con LA+(2) o LA-(12) y sin inhibidor(6); como controles incluimos a-PLP+(12) y normales(10). Consideramos ELISA+ los plasmas con valores >X<sub>Normal</sub>+3DS. Los hemofílicos con afVIII fueron + (14/14), observándose correlación entre los valores del ELISA y el título de afVIII ( $r=1$ ); 3/6 hemofílicos sin inhibidor fueron +, con valores menores a los observados en afVIII. Los controles fueron - (22/22). Este ELISA permitiría identificar a-fVIII, sin interferencia de a-PLP.

21. Determinación de IgG asociada a plaquetas por citometría de flujo (CF). Comparación con el ensayo por inmunodifusión radial(IR). CE Farías, AC Kempfer, MR Silaf, GA Carballo, Lazzari MA.

Academia Nacional de Medicina. CONICET. Buenos Aires

Determinar la cantidad de IgG relacionada a plaquetas es útil, pues existe un gran número de enfermedades en las cuales el enlace de anticuerpos puede, hacer sospechar una destrucción prematura de las plaquetas. Para la CF marcamos las plaquetas con antiglicoproteínas IIb-IIIa-FITC y antiIgG humana F(ab')2, biotina-PE; para IR el kit LC-Partigen IgG, Behring. Los valores normales previamente determinados son: IR expresado en fentograma/plaqueta (fg/pq) <7, n=20, CF expresado como media±2SD, 33±22 en unidades de intensidad de fluorescencia (UIF), n=94. Los pacientes con distintas patologías (n=40), fueron agrupados (CF e IR, normal u anormal)

	CF(UF<55) n=34	CF(UF≥55) n=6	IR (fg/pq<7) n=26	IR (fg/pq≥7) n=14
UIF media±SD	32±10	91±53 **	31±11	59±45*
fg/pq media±SD	6±3	21±15**	5±2	16±10**

\*\*p<0.001, \*p=0.005 utilizando los normales de cada grupo como referencia (t-test).

como se observa en la tabla. La técnica de IR arroja resultados anormales en 8 pacientes, que la técnica de CF los considera normales, por eso la significancia es distinta. Las diferencias podrían atribuirse a que: 1) la exactitud de CF es extremadamente buena, pues la medida de IgG se realiza sobre plaquetas individuales, además no interfieren los leucocitos ni los glóbulos rojos, 2) en CF, no hay IgG atrapada entre los intersticios plaquetarios y 3) la cantidad de moléculas de IgG totales (IR) o superficiales (CF) es distinta.

**Endocrinología I**

- 22. Regulación hormonal aguda sobre la expresión del mensajero de p43.** Carla V. Finkelstein, Paula Maloberti, E.J. Podestá.

Dpto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Univ. de Buenos Aires. Buenos Aires.

La p43 es una fosfoproteína novel intermedia en la regulación aguda de la síntesis de esteroides estimulada por ACTH en la zona fasciculata de la corteza adrenal de rata (ZF). En el presente trabajo, describimos la regulación del mensajero de p43 por ACTH. Análisis por Northern blot de preparaciones de ARN total de ZF de ratas tratadas con dexametasona (10 mg/l, Dx) en el agua de bebida toda la noche y ACTH (200 µg/Kg) i.p. a distintos tiempos, muestra un rápido y transitorio aumento en el mensajero (5 min) con un máximo a los 15 min post-estímulo retornando a los niveles basales a los 30 min (control 0,43±0,007 UA, ACTH: 5 min 0,59±0,053UA, 15 min 1,02±0,033UA y 30 min 0,46±0,008UA en unidades arbitrarias definidas como la relación de los valores de densitometría óptica para la sonda de p43 respecto de la 28S). Dx inyectada i.p. (5 mg/Kg) reduce los valores basales a 0,08±0,01UA mientras que la inyección de ACTH eleva este valor a 0,18±0,02UA. La relación de densitometría llegó a 3,22 cuando cicloheximida (10 mg/100g, CHx) fue inyectada 1h antes de ACTH. Actinomicina D (50 µg/100g) inyectada 1 hr antes del estímulo produce una inhibición del 80% respecto de los valores máximos de ACTH. Los resultados, sugieren que ACTH media dos efectos sobre la regulación de los niveles de ARNm de p43 actuando a nivel de la transcripción de novo y sobre la estabilización del ARNm. Los experimentos con CHx sugieren la participación de una proteína en la modulación del ARNm de p43.

- 23. Participación de los opioides endógenos en la secreción de LHRH.** CA Mastronardi, AG Faletti, A Lomniczi, ES Díaz, V Rettori y SM McCann.

(CEFYBO-CONICET) - Buenos Aires.

Los opioides inhiben la secreción de gonadotrofinas. Por este motivo se estudió la participación de  $\beta$ -endorfina 10<sup>-8</sup>M ( $\beta$ -end) sobre la secreción de LHRH, la síntesis y liberación de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) y la actividad de la óxido nítrico-sintasa(NOS). Estas mediciones se efectuaron sobre hipotálamos medios basales (HMBs) de rata macho adulta Wistar (250-300g). Los HMBs fueron incubados en ausencia (grupo control (CT)) o presencia de drogas, en baño termostático oxigenado (95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>) durante 30 minutos. La medición de la actividad de la NOS se realizó midiendo la [<sup>14</sup>C]-citrulina. Las secreciones de LHRH y PGE<sub>2</sub> se determinaron por RIA.  $\beta$ -end no afectó la secreción basal de LHRH, pero sí disminuyó la síntesis y liberación basal de PGE<sub>2</sub> (136.2+/-21pg) (n=15) vs. CT (215+/-25.9) (18) P<0.05.  $\beta$ -end afectó también la actividad basal de la NOS (4.87+/-0.16 pmoles NO) (14) vs. CT (7.57+/-0.1) (16) P<0.01.  $\beta$ -end bloqueó por una parte la secreción estimulada de LHRH por NP (5.76+/-0.42pg) (12) vs. NP (7.95+/-0.75) (14) P<0.01 y también bloqueó la síntesis y liberación de PGE<sub>2</sub> estimulada por NP (195+/-20.65pg)(14) vs. NP (339.43+/-29.27) (15) P<0.01. Estos resul-

tados demuestran que los opioides inhiben la secreción de LHRH estimulada, disminuyendo la actividad de la NOS y la síntesis y liberación de PGE<sub>2</sub>. A raíz de esta inhibición sobre la secreción de LHRH, disminuirían consecuentemente los niveles de gonadotrofinas.

- 24. Incremento de los niveles plasmáticos de Factor Natriurético Atrial (ANF) en pacientes con tumores productores de catecolaminas (CA).** Ana María Puyó\*, Gloria Levin#, Inés Armando#, BE Fernández\*, Marta Barontini#.

#Centro de Investigaciones Endocrinológicas. Htal. de Niños R. Gutiérrez. \*Cátedras de Biología Celular e Histología y Fisiopatología.. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.

El ANF es un péptido diurético, natriurético y vasodilatador que está involucrado en la regulación de la presión arterial. Algunos datos clínicos y experimentales indican que existiría una interacción entre las CA y el ANF; sin embargo, esto no está claramente establecido. En este estudio se determinaron las concentraciones plasmáticas de ANF en pacientes con tumores secretores de CA para investigar la relación entre CA, ANF y presión arterial. Se estudiaron 6 pacientes con neuroblastoma (Nb, 1 hipertenso), 21 pacientes con feocromocitoma (FC, 15 hipertensos) y 20 controles (C) normotensos, determinándose ANF por RIA y noradrenalina (NA), dopamina (DA) y DOPA plasmáticas por HPLC-EC. El ANF en los Nb (X ± SEM) (148 ± 36 pg/ml) y en los FC (94 ± 8 pg/ml) se encontró aumentado con respecto a los C (34 ± 3 pg/ml, p<0.001). La concentración de ANF en los Nb fue mayor que en los FC (p<0.03). No hubo diferencias en el ANF plasmático entre los FC hipertensos y normotensos (94 ± 4 vs 93 ± 10 pg/ml). El ANF no correlacionó con las presiones sistólica ni diastólica, la frecuencia cardíaca, ni la NA, DA y DOPA plasmáticas en pacientes ni en C. El hecho de encontrar aumento de ANF en ambos tipos de tumores sugeriría que el exceso de CA o los cambios hemodinámicos provocados por las mismas podrían inducir la secreción de ANF independientemente de la presión arterial.

- 25. Evaluación del rol del promotor Z en la expresión del gen CYP21B en células adrenales de ratón Y-1.A.** Dardis\*, G. Fu, G. Zhang, H. Rodriguez, W.L. Miller,

Department of Pediatrics, University of California, San Francisco, USA.

La región duplicada C4/21OH es un locus génico complejo en el cual 13 transcriptos diferentes se encuentran codificados en una región de 75-80 kb. Nueve de estos transcriptos se expresan en la corteza adrenal, sugiriendo la presencia de una única región de control del locus. El gen Z fue identificado como un único transcripto de 1kb cuyo promotor se encuentra ubicado entre los exones 35 y 36 del gen C4 (Hum Mol Genet 4:2109,1995). El objetivo de este estudio fue determinar si el promotor del gen Z contribuye a la expresión del gen CYP21B. Se realizaron distintas construcciones de regiones de 5,8; 4,8; 4,0; 3,5; 1,6 y 0,3kb co-

rriente arriba del gen CYP21B, ligadas al gen de la enzima luciferasa y clonadas en un vector de expresión. Se transfectaron células adrenales de ratón Y-1, evaluándose la actividad de la luciferasa en cada caso. Los resultados fueron comparados con la actividad de la construcción de 0,3 kb, que contiene el promotor del gen CYP21B. Un incremento significativo de la actividad luciferasa se observó solamente en las células transfectadas con la construcción que contiene la región de 5,8 kb ( $n=4$ ,  $p=0,027$ ). Estos datos muestran la presencia de elementos regulatorios positivos entre 4,8 y 5,8 kb corriente arriba del gen CYP21B. Dado que esta región contiene el promotor del gen Z, este promotor podría estar involucrado en la expresión del gen CYP21B.

**26. Influencia del sexo sobre la actividad hipotálamo-corticotropa en condiciones basales y post-adrenalectomía bilateral (ADX).** Andrea N. Chisari, Marcelo J. Perone y Eduardo Spinedi.

*Unidad de Neuroendocrinología, IMBICE (CIC-CONICET); La Plata.*

La integridad del eje hipotalámico-hipofiso-adrenal (HHA) es fundamental para la adaptación del organismo ante situaciones de estrés. Existen claras evidencias que los esteroides sexuales juegan un rol modulatorio de la función HHA y características sexo-dependientes han sido relacionadas con una diferente susceptibilidad del individuo para contraer ciertas enfermedades. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la influencia del sexo sobre la actividad hipotálamo-corticotropa (HC), en condiciones basales y post-ADX, en la rata. Ratas adultas y de ambos sexos sometidas a operación SHAM o ADX se estudiaron luego de 3 y 6 semanas. Se determinó: a) la concentración plasmática de ACTH; b) el contenido tisular de diversos péptidos [ACTH en hipófisis anterior, CRH y vasopresina (AVP) en hipotálamo medio basal (HMB) y en eminencia media (EM)]; y c) la liberación de CRH y AVP por perfusión *in vitro* de EMs. Dado que las relaciones de los contenidos AVP/CRH ( $r$ ) en HMB y EM son representativas de la actividad de síntesis y secreción de ACTH hipofisaria es que hemos expresado los resultados en tales relaciones. Nuestros estudios mostraron que, en condiciones basales, las relaciones no difieren significativamente entre sexos [ $r$  de HMB:  $1,74 \pm 0,1$  y  $1,81 \pm 0,2$  y  $r$  de EM:  $8,54 \pm 1,1$  y  $7,15 \pm 0,94$ , en hembras y machos respectivamente]. Sin embargo, ante la falta de glucocorticoides endógenos estas  $r$  aumentan y muestran un marcado dimorfismo sexual a las 6 semanas post-cirugía, siendo en HMB:  $8,25 \pm 0,57$  y  $5,11 \pm 0,58$  ( $p < 0,05$ ) y en EM:  $35,6 \pm 4,48$  y  $23,42 \pm 2,3$  ( $p < 0,05$ ), para hembras y machos, respectivamente. Estos resultados demuestran que existiría una potencial acción modulatoria de los esteroides gonadales, puesta de manifiesto fundamentalmente ante la ausencia de glucocorticoides endógenos, sobre la actividad del sistema HC y ejercida a nivel de la producción de neuropéptidos hipotalámicos secretagogos de ACTH.

**27. Efecto de la estimulación adrenérgica *in vitro* del ganglio celíaco sobre la función ovárica al final de la preñez.** M. Casais, L. Villegas, A. Rastrilla y L. Aguado.

*Laboratorio Biología de la Reproducción. Univ. Nacional de San Luis. San Luis.*

La participación adrenérgica sobre la función luteal al final de

la preñez, fue evaluada a través de la estimulación ganglionar y su efecto sobre la liberación de Progesterona (P) ovárica. Se desarrolló un sistema *in vitro* Ganglio Celíaco-Nervio Ovario Superior-Ovario (GC-NOS-O), utilizando ratas de la cepa Holtzman de 19, 20 y 21 días de preñez. 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 unidas por el NOS. Noradrenalina (NA), Propranolol (Prop) o Fentolamina (Fa) en concentración  $10^{-6}$  M fueron adicionadas al ganglio y se determinó en la celda ovárica, la P liberada (ng/mg ovario) a los 30, 60, 120 y 180 minutos. La estimulación ganglionar con NA en el día 19 provocó un aumento significativo en la liberación de P ( $0,35 \pm 0,07$  vs  $0,09 \pm 0,02$ ;  $p < 0,01$ ), Fa un efecto inverso ( $0,05 \pm 0,002$  vs  $0,09 \pm 0,02$ ;  $p < 0,025$ ) mientras que Prop no modificó los niveles basales ( $0,13 \pm 0,02$  vs  $0,09 \pm 0,02$ ). En el día 20 se observó un efecto inhibitorio en los tres casos ( $0,08 \pm 0,01$ ;  $0,08 \pm 0,01$  y  $0,07 \pm 0,01$  vs  $0,17 \pm 0,003$  respectivamente), mientras que en el día 21 no hubo modificaciones significativas ( $0,05 \pm 0,01$ ;  $0,03 \pm 0,006$  y  $0,05 \pm 0,006$  vs  $0,04 \pm 0,01$  respectivamente). Los resultados obtenidos permiten visualizar un notable cambio del estado neural del ganglio entre los días estudiados, anulándose los efectos con la instauración de la luteólisis.

**28. La acción de agentes adrenérgicos sobre el ganglio celíaco modifica la respuesta ovárica, vía NOS, de la secreción de progesterona en el ciclo estral.** Z. Sosa, L. Aguado.

*Lab. de Biología de la Reproducción. Universidad Nacional de San Luis. San Luis.*

En estudios previos estimulando el Ganglio Celíaco (GC) en el sistema integrado *in vitro*: GC-Nervio Ovario Superior (NOS)-Ovario (O), se observaron modificaciones en la liberación de Progesterona (P) desde el O. Se estudió la respuesta del O a la estimulación ganglionar adrenérgica en las distintas fases del ciclo estral. A ratas Holtzman de 90 días en Estro (E), Diestro I (DI), Diestro II (DII) y Proestro (PE), bajo anestesia, se extrae el sistema. Se colocan en celdas separadas el O y el GC unidas por el NOS. Se incuba el ganglio con Noradrenalina (NA), Propranolol (Prop), y Fentolamina (Fa) ( $10^{-6}$  M) en ácido ascórbico y se determina la concentración de Progesterona (P) en el líquido de incubación del O, a diferentes tiempos (30, 60, 120, 180'). En PE, NE aumenta la liberación a los 30' ( $p < 0,001$ ), Fa disminuye la liberación en forma significativa en todos los tiempos ( $p < 0,001$  vs control), Prop no difiere respecto de sus controles. En DI, NE aumenta la liberación de P ( $p < 0,001$ ), Fa la disminuye ( $p < 0,001$ ) y con Prop no difiere de sus controles. En E, NE no muestra diferencias de sus controles, mientras que Fa y Prop, aumenta ( $p < 0,001$ ). En DII, NE muestra una disminución en la liberación de P ( $p < 0,001$ ), Prop aumenta ( $p < 0,001$ ) y Fa no muestra diferencias. Los datos obtenidos sugieren qué la estimulación con agonistas adrenérgicos produce la liberación de sustancias intermedias desde el ganglio, que son estimulante de la liberación de P en DI e inhibitorias en DII.

**29. Efecto de un análogo de GnRH sobre apoptosis en folículos ováricos de ratas tratadas con gonadotrofinas.** Fernanda Parborell, Claudia Andreu, Lucía Chemes y Marta Tesone.

*Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME).*

*CONICET y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,  
UBA, Buenos Aires.*

Tratamientos prolongados con análogos de GnRH son utilizados en la clínica con el objeto de suprimir la secreción endógena de gonadotrofinas, sin embargo estos análogos ejercen un efecto directo sobre el ovario. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la administración de un análogo de GnRH (Acetato de leuprolide, LA) sobre la luteinización folicular. Se injectó LA (1 µg/rata/día) a ratas prepúberes superovuladas con eCG+hCG. Estudios en cortes histológicos de ovarios obtenidos a distintos tiempos de tratamiento con LA muestran una disminución en el número de folículos antrales (A) y cuerpos luteos (CL), y mayor cantidad de folículos preantrales (PA) y atrésicos (FA). (48 hs-PA=Control(C):18.5±3, LA:28.1±2; A=C:17.1±2, LA:8.5±2; FA=C:3.8±1, LA:9.5±1; CL=C:3.6±0.4, LA:1.2±0.5 folículos o CL/corte; p<0.05). Se observó la presencia de cuerpos apoptóticos y compactación de la cromatina en folículos en crecimiento y atrésicos de ambos grupos. La cuantificación de la fragmentación del DNA en cortes de ovario se realizó por técnicas inmunocitoquímicas (TUNEL). Luego de 2 días de tratamiento con LA se produjo un aumento en el número de células apoptóticas (40 y 8 veces de aumento en PA y A respectivamente) Efecto similar, aunque menos pronunciado se observó en CL. Estos resultados fueron confirmados en geles de agarosa de DNA extraído de folículos o CL. Se concluye que la administración de LA causa un incremento de la apoptosis ovárica, produciendo como consecuencia una interferencia en el crecimiento y luteinización folicular inducida por gonadotrofinas.

**30. Actividad de la superóxido dismutasa en hipertiroidismo.** Silvia Moiguer, L.N.Borodinsky, M.Karner, K.C.Ricart, M.L.Fiszman, J.A.Burdman.

*Servicio de Endocrinología, Hospital Israelita "Ezrah". Departamento de Neurociencias Fundación "CIMAE". Buenos Aires.*

En el hipertiroidismo (HT) se produce un aumento del consumo de oxígeno y la producción de radicales libres. Evaluamos la actividad de la enzima antioxidante Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD1) citosólica en HT pre y post tratamiento. La actividad SOD1 en 125 controles normales de varios grupos etarios fue de x:38±9. En 11 pacientes hipotiroides la SOD1 estaba aumentada a x: 69.8±10.5 (p<0.01 vs normales) coincidiendo con un score clínico elevado (entre 4 y 5 puntos para un máximo de 5), captación de I<sup>131</sup> aumentada y hormonas tiroideas altas. Luego del tratamiento con metilmercaptoimidazol o dosis terapéutica con I<sup>131</sup>, la actividad SOD1 disminuyó a los 2-4 meses a x: 46.1±6.0 (NS vs normales, p<0.05 vs HT) junto con la normalización de las hormonas tiroideas circulantes y la disminución del score clínico a 2. Dos pacientes con recidiva de HT cursaron con SOD1 normal y score clínico bajo (2 puntos). Dos pacientes hipotiroides presentaron SOD1 normal. Concluimos que la producción de radicales libres podría estar involucrada en la fisiopatología de los síntomas y signos del HT y por lo tanto los antioxidantes podrían ser útiles en el tratamiento sintomático de esta enfermedad.

**31. Determinación de la fracción libre de la proteína sérica que une hormona de crecimiento (GHBP) para el monitoreo de tratamientos con antagonistas de la hormona de crecimiento.** Ana Sotelo, D. Turyn.

*IQUIFIB-Depto de Química Biológica, Fac. Farmacia y*

*Bioquímica, UBA., Buenos Aires.*

Con el objeto de establecer qué concentración de antagonistas de la hormona de crecimiento (GH) sería necesario administrar en el tratamiento de patologías que cursan con elevados niveles de la hormona, se propone la determinación de la concentración de GHBP libre como medida de la efectividad de la terapia. Como modelo se utilizaron ratones transgénicos que expresan un análogo de GH bovina (bGH), la G119K-bGH. Los ratones son enanos. Para ratones normales puede determinarse la concentración de GHBP libre como el porcentaje de unión de radiolíngido unido a suero. En cambio, para los ratones transgénicos, la GHBP sólo se pudo determinar por RIA, dado que presentan concentraciones circulantes muy elevadas del análogo (> 1 µg/ml) y, por lo tanto, la GHBP presente está unida a la G119K-bGH (no se encuentra libre). La concentración de GHBP total fue de 0.6 ± 0.4 nM para ratones normales y de 1.7 ± 0.4 nM para ratones transgénicos, mientras que los niveles de IGF-I, 250 ± 8 ng/ml y 91 ± 5 ng/ml, respectivamente. Estos resultados sugieren que, si bien el análogo es un antagonista, induce la síntesis de la GHBP, lo que implica una mayor dosis del antagonista para lograr el efecto deseado. Se demuestra que es necesario alcanzar un nivel de análogo circulante superior a 2 µg/ml para mantener a los receptores soluble y de membrana ocupados, es decir, incapaces de unir a la GH endógena, activa.

**32. Poliaminas en luteomas experimentales.** P. F. Hockl, S. M Thyssen-Cano, A. Chamson-Reig, VAR Lux-Lantos, C. Libertun.

*Laboratorio de Neuroendocrinología, IByME, CONICET. UBA, Buenos Aires.*

Las poliaminas putrescina (P), espermidina (SPD) y espermina (SPM) son poliacetilaciones alifáticas presentes en todas las células, que intervienen en procesos de proliferación y diferenciación. Nuestro objetivo es cuantificarlas en luteomas experimentales (L) de 6 semanas de desarrollo, generados por autotransplante de un ovario en el bazo de la rata. La gónada secreta a la circulación portal los esteroides que son inactivados en el hígado. Al disminuir la retroalimentación negativa hay hipergonadotrofia e hiperestimulación del ovario transplantado con luteinización intensa del mismo. Las poliaminas se midieron por un método de HPLC perfeccionado en nuestro laboratorio, sencillo y con equipamiento estándar (detección UV). Comparamos el luteoma con ovarios en estro (OE=cuerpos luteos frescos) y con prepúberes superovuladas (PPSO=cuerpos luteos frescos muy abundantes). La concentración de P en µmoles/mg de DNA, esta disminuida en el luteoma (0.21 ± 0.05) respecto de OE (0.77 ± 0.10), p < 0.05. Las otras poliaminas no evidencian cambios (µmoles/mg de DNA SPD: L=10.39 ± 0.66; OE= 11.74 ± 1.89. SPM: L=10.36 ± 0.48; OE=10.45 ± 1.64). En las PPSO las concentraciones son mayores que en los grupos anteriores (P:1.26 ± 0.09; SPD:20.85 ± 2.13; SPM:17.94 ± 1.11) p < 0.01 respecto de L y p < 0.01 respecto de OE. Comparando las proporciones relativas de cada poliamina, los OE presentan igual distribución que las PPSO (L: P=3% SPD=51% SPM=46% - PPSO: P=3% SPD=52% SPM=45%) a pesar de la diferencia en los valores absolutos, mientras que en los luteomas disminuye la proporción de putrescina a expensas de espermina (P=1% SPD=50% SPM=49%). Concluimos que la concentración de poliaminas se reduce selectivamente en los luteomas, los que presentan una proporción relativa alterada. Las diferencias podrían relacionarse con el tiempo transcurrido desde el comienzo de la luteinización.

- 33. Isoformas circulantes de SHBG en la Hipertricosis Prepuberal Idiopática.** Patricia Bedecarrás, Mirta Gryngarten, María Eugenia Escobar, Sandra Ayuso, Stella Campo.

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

Previamente hemos determinado el perfil de isoformas de SHBG circulantes en niñas prepuberales normales: SHBGI, pl: 5.2-5.4; 8.8±3.1%; SHBGI, pl: 5.4-5.6; 58.8±12.6%; SHBGIII, pl: 5.6-5.8; 31.8±0.1% (media ± DS de la distribución porcentual de isoformas recuperadas en isoelectrofoque preparativo). El objetivo del presente trabajo fue determinar el perfil de isoformas de SHBG circulantes en 5 niñas con hipertricosis prepupal idíopática (HPI) con niveles de andrógenos y SHBG normales, y aumento significativo de los niveles de glucurónido de androstanodiol. Las pacientes presentaron diferencias en la distribución de: SHBGI: 43.2±11.5% ( $P<0.001$ ) y SHBGIII: 14.2±4.4% ( $P<0.001$ ). La estructura de la porción carbohidratada interna al ácido siálico terminal de las isoformas de SHBG fue estudiada en Concanavalina A (Con A). Se aislaron isoformas no retenidas (NR), débilmente retenidas (DR) y fuertemente retenidas (FR). En todas las pacientes estudiadas las isoformas de SHBG fueron completamente retenidas por la lectina, en forma similar al grupo control. Nuestros resultados muestran que en la HPI, que presenta un aumento de la actividad 5α-reductasa periférica, hay un aumento de la proporción de las isoformas de SHBG más ácidas, mientras que la estructura de la cadena carbohidratada interna al ácido siálico terminal no presenta alteraciones respecto del grupo control.

- 34. Interacción entre la prostaglandina F<sub>2</sub> Alfa y la actividad de la óxido nítrico sintasa en el oviducto de la rata.** S Pérez Martínez, A Franchi, JM Viggiano, MB Herrero y MAF Gimeno.

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO), Buenos Aires.

El oviducto de varias especies de mamíferos produce prostaglandinas (PG'S) y es sensible a sus efectos. Asimismo, es frecuente la interacción entre los metabolitos de la ciclooxygenasa (COX) con la óxido nítrico sintasa (NOS). Por lo tanto, investigamos el efecto modulador de la PGF<sub>2</sub> alfa sobre la actividad de la NOS en el oviducto de rata. Se determinó la actividad de la NOS mediante el ensayo de conversión de <sup>14</sup>C-L-arginina a <sup>14</sup>C-L-citrulina. Oviductos aislados de ratas estrogeneizadas (1μg E<sub>2</sub>/rat) produjeron 3.3±0.4 pmoles de <sup>14</sup>C-L-citrulina/100mg/min. La incubación en presencia de 10<sup>-8</sup>M aumentó la actividad de NOS a 6.2±0.6 pmol (p<0.05), mientras que oxitocina (1.25 mU/mL) produjo un aumento similar (6.0±0.6). El efecto de la PGF<sub>2</sub> alfa fue anulado por inhibidores de la NOS (L-NAME 0.6m+PGF<sub>2</sub>alfa: 3.2±0.4; aminoguanidina 0.5m + PGF<sub>2</sub>alfa: 3.0±0.3). En medio libre de Ca<sup>2+</sup>, PGF<sub>2</sub> alfa aumentó significativamente la actividad de NOS Ca<sup>2+</sup>-independiente (0.85±0.31 vs. 1.97±0.29; p<0.05). También se estudió la respuesta contráctil del órgano aislado: la curva D-R de PGF<sub>2</sub> alfa en presencia de inhibidores de la NOS se desplaza a la izquierda y aumenta el efecto máximo de estimulación. En conclusión, se observa en el oviducto de rata una interacción PGF<sub>2</sub> alfa en presencia de inhibidores de la NOS se desplaza a la izquierda y aumenta el efecto máximo de estimulación. En conclusión, se observa en el oviducto de rata una interacción PGF<sub>2</sub> alfa -NOS: mientras la PGF<sub>2</sub> alfa modula a la NOS aumentando la actividad Ca<sup>2+</sup>-independiente, el óxido

nítrico disminuye la actividad contráctil de la PGF<sub>2</sub> alfa sobre la musculatura lisa del oviducto.

- 35. Efecto de noradrenalina y neuropéptidos sobre la secreción de progesterona de ovarios de rata *in vitro*.** M Garraza, L Villegas, M De Bortoli, L Aguado.

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

Es conocida la presencia de neuropéptidos en el ovario de mamíferos y algunas de sus funciones han sido caracterizadas. El objetivo del trabajo fue estudiar los efectos de neuropéptido Y (NPY) y péptido intestinal vasoactivo (VIP) sobre la liberación de progesterona (P) de ovarios *in vitro*. Se trabajó con ratas hembras vírgenes Holtzman de peso: 275±25g, en diestro II. Se incubaron hemiovários en buffer Krebs-Ringer (con glucosa y albúmina, 0.1 mg/ml de cada uno), a 37°C en baño metabólico. La incubación duró 180', con el agregado previo de: a) ácido ascórbico 10 mg % (basales); b) noradrenalina (NA) 10<sup>-7</sup> M; c) VIP 50 ng/ml; d) NPY 50 ng/ml; e) NPY+NA; f) VIP+NA. Las concentraciones detalladas son las finales en el medio. Se extrajo medio de incubación a los 30', 60', 120' y 180', y se dosó P por RIA. Las comparaciones estadísticas se realizaron con test *t* de Student. Resultados: (medias ± SEM ng/ml) P basal: a 30'=0.17±0.01; a 60'=0.28±0.03; a 120'=0.60±0.08; a 180'=1.04±0.15. Tanto NA como VIP estimulan la liberación de P en todos los tiempos (NA p<0.05 vs basal; VIP p<0.01 vs basal). NPY aumenta la liberación de P sólo a los 180' (p<0.01 vs basal). Con NPY+NA (e), el aumento de P se potencia en todos los tiempos (p<0.001 vs NPY; p<0.025 vs NA). Con VIP+NA (f), el aumento de P se potencia en todos los tiempos (p<0.001 vs NA; p<0.025 vs VIP). Los péptidos NPY y VIP individualmente estimulan la secreción de P en el ovario *in vitro*, y ese efecto es potenciado por la presencia de NA.

- 36. Correlación de la actividad de metiltransferasa con la inervación del ovario de rata *in vivo* e *in vitro*.** Mirta Carrasco, L.B. Oliveros y L.I. Aguado.

Laboratorio de Biología de la Reproducción (LABIR). Fac. Qca., Bqca. y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis. San Luis.

Habiendo caracterizado el sistema de metiltransferasas (MET) en ovario y demostrado que su actividad se modifica con el ciclo estral, en este trabajo se estudió la posible correlación entre dicho sistema enzimático y la densidad de receptores β-adrenérgico (Rβ) del ovario en ratas Holtzman. Experimento I, *in vivo*: en ratas de 200 g, en diestro, se practicó corte del Nervio Ovario Superior (NOS) bilateral y los animales se sacrificaron a los 20 días. Controles con operación simulada. La actividad de MET se midió en membranas de ovario en pmol [<sup>3</sup>H]-S-adenosilmetionina/mg proteína/30 min. Experimento II, *in vitro*: de ratas de 30 días de edad se aislaron las células granulosas que se cultivaron por 48 hs en medio Mc Coy con norepinefrina (NE) 10<sup>-7</sup>M (bajos Rβ) y sin NE (altos Rβ) y se midió la actividad de MET y la concentración de progesterona (P) liberada en el medio (ng/ml). Resultados: témino medio y error, significancia por test de Student. Exp I: 0.73±0.1 (NOS) vs 0.45±0.02 (control), p<0.001. Exp II: MET, 0.61±0.04 (bajos Rβ) vs 0.9±0.06 (altos Rβ) p<0.001; P, 0.26±0.01 (bajos Rβ) vs 0.4±0.01 (altos Rβ) p<0.001. El aumento de actividad de MET en el grupo NOS induciría un aumento del N° de Rβ. Se observa: a) Correlación entre la densidad de Rβ, actividad de MET y estimulación adrenérgica. b) Posible control neural de la actividad de MET.

**Gastroenterología I**

- 37. Alteraciones morfológicas y funcionales inducidas por vasopresina (VP) en duplas de hepatocitos aisladas: I. Estudios dosis-respuesta.** M.G. Roma, Vicki Stone, R. Shaw, R. Coleman.

*IFISE-Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. U.N.R. School of Biochemistry. The Birmingham University. Rosario.*

Se analizó en duplas de hepatocitos aislados el efecto que tiene la VP sobre la formación de ampollas de membrana y sobre la capacidad para acumular y retener en el canalículo la sal biliar fluorescente colil-lisil-fluoresceína (CLF) (tests de capacidad secretora y de integridad de la vía paracelular, respectivamente), así como su relación con alteraciones en la distribución de actina celular. La administración de VP (0.01-100 nM) produjo la formación dosis-dependiente de ampollas de membrana, alcanzando un máximo a una concentración de 10 nM ( $76 \pm 6\%$  de duplas presentando al menos una ampolla). El análisis de la distribución de F-actina por microscopía confocal de fluorescencia reveló que VP produjo una reducción de la cantidad de actina en las cercanías del canalículo biliar (Control:  $24.7 \pm 1.0$ , VP:  $18.5 \pm 1.5\%$  del total de fluorescencia celular;  $p<0.05$ ). El porcentaje de duplas que exhibieron acumulación canalicular visible de CLF, así como el porcentaje que retuvo CLF una vez excretada, disminuyeron paralelamente con la dosis de VP, alcanzando un mínimo a una concentración de 10 nM (Acumulación: Control:  $74.1 \pm 2.3\%$ , VP:  $48.2 \pm 2.4\%*$ ; Retención: Control:  $70.3 \pm 2.9\%$ , VP:  $49.4 \pm 3.4\%*$ ; \* $p<0.05$ , respectivamente). Se concluye que VP es capaz de producir alteraciones morfológicas y funcionales de membrana asociadas a disrupción de la integridad estructural del citoesqueleto de actina.

- 38. Anticuerpos anti-receptor muscarínico M<sub>2</sub> (AcsRM<sub>2</sub>) en pacientes chagásicos con acalasia.** Juan Carlos Goin, C Bilder, L Monastral, M Castro Ríos, G Iantorno, L Sterin-Borda, E Borda.

*CEFYBO-CONICET, Cátedras de Odontología y Medicina, UBA; Laboratorio de Motilidad, Hospital B. Udaondo. Buenos Aires.*

Previamente demostramos la presencia de AcsRM<sub>2</sub> en pacientes chagásicos (Pch) con disautonomía cardiovascular. En este trabajo se investigó la presencia de estos Acs en el suero de Pch con acalasia (A) y su capacidad para modular señales intracelulares asociadas a RM<sub>2</sub> en el músculo liso. Se determinó la prevalencia de AcsRM<sub>2</sub> séricos, valorados por ELISA, en Pch con (A+) y sin (A-) acalasia, resultando: PchA+: 7/8 (87%); Pch A-: 2/8 (25%). Grupo control normal: 0/20 (0%). Estos resultados indican una fuerte asociación entre presencia de AcsRM<sub>2</sub> séricos y acalasia en los Pch estudiados ( $\chi^2=4.06$ ;  $p<0.05$ ). La fracción IgG sérica total de los PchA+, así como los AcsRM<sub>2</sub> específicos purificados por inmunoadsorción inhibieron la estimulación de los niveles de AMPc en el feto aislado de rata, comportándose como agonistas muscarínicos a semejanza del carbachol, de acuerdo a los siguientes valores (pmol AMPc/mg): Basal:  $0.46 \pm 0.05$ , Control (estimu-

lado con PGE<sub>1</sub>) ( $10^{-6}$ M):  $1.51 \pm 0.04$ , Carbachol ( $10^{-6}$ M):  $0.88 \pm 0.05$ , IgG total de PchA+ ( $5 \times 10^{-6}$ M):  $0.97 \pm 0.11$ , IgG AcsRM<sub>2</sub> específica ( $2.5 \times 10^{-6}$ M):  $0.46 \pm 0.07$ , (n=5). Los resultados sugieren que los AcsRM<sub>2</sub> podrían participar en el desarrollo de la acalasia chagásica a través de la inhibición de la estimulación de AMPc.

- 39. Lipoperoxidación (LPO) en el proceso de regeneración hepática: Efecto del tratamiento con aminoguanidina (AMG).** Celina Scapini, María Cristina Carrillo, C. Favre, J.A Monti, Cristina Carnovale.

*IFISE-CONICET, Fac. de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas.-UNR. Rosario .*

Luego de una hepatectomía parcial (HP) se ha descripto un aumento de los niveles hepáticos de LPO a las 24 h y una inducción de la enzima óxido-nítrico sintasa 2 (NOS 2) que produce un máximo de NO entre las 4 y 6 h. Se analizó la participación del NO en los niveles hepáticos de LPO durante el proceso de regeneración hepática. Ratones Wistar machos adultos fueron divididos en 3 grupos: Control (C) (n:10), Sham (S) (n:16) y Hepatectomizado (HP 65%) (n:16); la mitad de los animales de cada grupo recibió AMG (inhibidor de NOS 2) 100 mg/Kg PC i.p. cada 24 h durante 3 días. Al cuarto día se practicó la cirugía a los grupos S y HP, sacrificándolos a las 5 y 24 h. En homogenado total de hígado se determinó LPO (nmol de malondialdehído-MDA/-100 mg proteína). LPO: C:  $72 \pm 19$ ; S-5h:  $114 \pm 5^*$ ; HP-5h:  $155 \pm 37^*$ ; HP-24h:  $230 \pm 20^*$  (\* $p<0.05$ ). El pretratamiento con AMG no produjo modificaciones en LPO del C; por el contrario, en S-5h y HP-5h hubo una desaparición de los aumentos observados. En HP-24h el pretratamiento disminuyó 15% el aumento observado. Se concluye que la disminución de la LPO producida por la inhibición de NOS 2 pone en evidencia la participación del NO en la LPO durante la fase de iniciación del proceso regenerativo.

- 40. Efecto de HDL sobre la susceptibilidad a la oxidación in vitro de LDL (SOx-LDL).** Silvia Sanguineti, Verónica Fasulo, Regina Wikinski, Laura Schreier.

*Lab. de Lípidos y Lipoproteínas- Dpto. de Bioquímica Clínica-Fac. de Farmacia y Bioquímica- UBA*

La SOx-LDL está aumentada en pacientes con enfermedad cardiovascular aterosclerótica. La SOx-LDL no sólo depende de las características físico-químicas de LDL sino también de su interacción con otras lipoproteínas. Nuestro objetivo fue evaluar la influencia de HDL sobre la SOx-LDL, incluyendo HDL en el ensayo de SOx-LDL. Se separó LDL y HDL de muestras séricas (n=7) por ultracentrifugación. Se incubó LDL 10 mg/prot, con Cu<sup>2+</sup>10 mM a 37°C, en ausencia y en presencia de HDL. Variando la relación entre lipoproteínas, se seleccionó 20 mg/dl como concentración óptima de HDL siendo la relación prot-LDL/prot-HDL 1:2. La SOx-LDL se evaluó por a) TBARS después de 2 hs de incubación, nmol MDA/mg prot-LDL, b) velocidad de produc-

ción de dienos conjugados (n) medida a 234 nm, D Abs/min y c) la relación de electronegatividad (REM), después de 5 hs de incubación. Se observó: a) Inhibición en la producción de TBARS, Mediana (Rango): 48 % (19-100), p<0,01 b) Disminución de la y de propagación: 23,3% (14,3-33,3), p<0,005 c) Disminución del REM: 11% (4,1-18,4), p<0,005. HDL inhibió en todos los experimentos la SOx-LDL evaluada por los 3 parámetros utilizados. Esta acción antioxidante de HDL podría contribuir a su función antiaterogénica.

**41. Hipertrigliceridemia y eflujo de colesterol celular** Carla D Bonavita, F Brites, M Yael, G Castro, R Wikinski.

*Lab Lípidos y Lipoproteínas, Dto. Bioquímica Clínica, FFyB, UBA.*

La hipertrigliceridemia (HTG) ha sido asociada con alteraciones cualitativas y cuantitativas de los componentes de HDL. Esto podría afectar el transporte inverso del colesterol (TRC), vía por la cual la HDL transporta el colesterol en exceso de los tejidos periféricos al hígado. Nuestro objetivo es estudiar el eflujo de colesterol celular, primer paso del TRC, en hombres con bajo colesterol HDL (c-HDL) y altos triglicéridos (TG) plasmáticos (grupo 1, n=12) y con bajo c-HDL y TG normales (grupo 2, n=12) comparándolos con 12 controles sanos. Se incubó suero entero y fracciones de HDL aisladas por cromatografía de filtración por geles con células de hepatoma de rata Fu5AH o macrófagos de ratón J774 cargados con colesterol tritiado. La capacidad del suero de los pacientes con bajo c-HDL (grupos 1 y 2) para promover el eflujo de colesterol celular se encontró reducida en ambos tipos celulares: a) células Fu5AH, grupos 1 y 2, 26% y 33% menor que controles respectivamente ( $P<0,001$ ); b) macrófagos J774, grupos 1 y 2, 17% y 15% menor que controles respectivamente ( $P<0,01$ ). Solo la HDL aislada del suero de pacientes con HTG (grupo 1) fue menos eficiente para promover el eflujo de colesterol de células Fu5AH que los controles. La composición de HDL en los pacientes del grupo 1 mostró un enriquecimiento en TG ( $P<0,05$  vs grupo 3) y una deplección en colesterol ( $P<0,01$  vs grupo 3). En este estudio se evidencia que una baja concentración de HDL afecta el eflujo de colesterol celular, pero que además alteraciones cualitativas de HDL asociadas a la HTG son también determinantes en el primer paso del TRC.

**42. Efecto inhibitorio de bilirrubina sobre la actividad hemolítica del complemento (C).** Sandra M. Arriaga, Adriana M. Almará, A.D. Motino.

*Dto. de Bioquímica Clínica. IFISE. CIUNR. CONICET. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Rosario.*

Se estudió el efecto de bilirrubina no conjugada (BNC) y su conjugado natural, monoglucurónido de bilirrubina (MGB), sobre la actividad hemolítica del C. El C (suero humano) fue incubado a 37 °C con eritrocitos de camero sensibilizados ( $5 \times 10^6$  células/ml) en presencia o ausencia (control) de distintas concentraciones de BNC o MGB. La hemoglobina de los sobrenadantes se valoró a 410 nm. Las densidades ópticas se compararon con la obtenida para un testigo del 100 % de hemólisis preparado con agua destilada. Tanto BNC como MGB inhibieron la hemólisis de manera dosis dependiente. Los % de hemólisis para BNC (0; 1; 2; 2,5; 3,3 y 5 mg/dl; n=3) fueron respectivamente: 88,0±1,4; 78,5±4,8; 58,0±2,8\*; 14,0±19,8\*; 1,0±1,0\* y 0,3±0,6\*. El agregado de albúmina sérica bovina (2,5 y 5 g/dl), un estabilizante del

pigmento, no modificó sustancialmente el efecto inhibitorio de BNC. Los % de hemólisis para MGB (0; 3,3; 5; 7 y 10 mg/dl; n=3) fueron respectivamente: 85,5±2,1; 73,5±0,7\*; 34,0±12,7\*; 5,0±7,1\* y 1,0±1,4\*. (\*) diferente del control ( $p<0,01$ ). Se concluye que BNC, tanto libre como unida a albúmina, y MGB poseen propiedades anticomplementarias. Esto sugiere una implicancia inmunológica del pigmento en hiperbilirrubinemias no conjugadas y conjugadas.

**43. Preservación hipotérmica de hígado en solución de la Universidad de Wisconsin (UW) y Nitroprusiato de Sodio (NPNa). I-Estudios histológicos.** Alejandra Quintana<sup>1</sup>, E.E. Guibert<sup>2</sup>, A Scandizzi, L. Almada, A. Martinez<sup>1</sup> y JV.Rodríguez.

<sup>1</sup>Morfología, <sup>2</sup>Biología Molecular y Farmacología, Facultad Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. Rosario.

La función hepática post-trasplante depende de las condiciones de preservación. Por ello se decidió estudiar el efecto que produce la adición de NPNa (500 μM) a la sol. UW sobre hígados de ratas Wistar, preservados 24, 48 y 72hs (4°C) y reperfusados en un sistema aislado con Krebs-Henseleit/Albúmina bovina 2%. El daño histológico se determinó en biopsias obtenidas durante la preservación y post reperfusión. Los hígados preservados en UW mostraron hepatocitos (HC) balonizados con halo perinuclear vacío (HPV) y pérdida de la arquitectura trabecular (72hs). En UW+NPNa se observó un patrón similar sin HPV. En la reperfusión, el grupo UW mostró desprendimientos de células endoteliales, vacuolización en zonas perivenosa y media, siendo máxima a las 72hs, con pérdida de arquitectura trabecular. En UW+NPNa, hasta 48hs se observó una mejor conservación, sin HC vacuolizados. Se concluye que NPNa revierte el daño asociado a reperfusión de hígados preservados hasta 48hs.

**44. Taurocolato (TC) inhibe la degradación lisosomal de peroxidasa de rabanito (HRP) en la rata.** M. Cecilia Larocca, J.M. Pellegrino, E.A. Rodriguez Garay, R.A. Marinelli.

*IFISE-CONICET, UNR. Rosario.*

La heterofagia es una función crítica del hígado que involucra endocitosis, transporte vesicular, fusión de vesículas y degradación lisosomal. TC modula el tráfico vesicular y tiene efecto inhibitorio sobre el catabolismo de proteínas endógenas. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de TC sobre el proceso de heterofagia hepática, evaluando el metabolismo de la proteína exógena HRP unida covalentemente a [<sup>14</sup>C]sacarosa (<sup>14</sup>CSac-HRP) y comparando con el efecto de la sal biliar no formadora de micelas dehidrocolato (DHC). Ratones Wistar machos fueron infundidos con TC (n=7), DHC (n=4), (0,8 μmol/min 100g), o sol. fisiol. (n=8). Se inyectó en vena porta <sup>14</sup>CSac-HRP, y a los 30 min se determinó: <sup>14</sup>C total captado (% de la dosis), %<sup>14</sup>C total en fracción enriquecida en lisosomas (ML), y %<sup>14</sup>C soluble en TCA 10% en ML, como estimadores de captación, transporte a lisosomas y degradación lisosomal de HRP, respectivamente. También se evaluó el efecto de TC y DHC sobre proteasas lisosomales (cathepsinas D, B, H y L). TC o DHC no alteraron la captación (TC 39±5%, DHC 32±6%, C 39±4%) ni el transporte a lisosomas (TC 115±9%, DHC 102±11%, C 105±9%). Se observó, en cambio, inhibición en la degradación lisosomal de HRP (TC 17±2%, DHC 19±2%, C 26±1%). No existió efecto directo sobre las cathepsinas ensayadas.

\* $p<0.05$ . Conclusión: Tanto TC como DHC, inhiben el proceso de heterofagia a nivel del metabolismo lisosomal, sin efecto directo o permanente sobre catepsinas, sugiriendo un mecanismo indirecto que podría involucrar cambios en el pH lisosomal.

**45. Lípidos en pulmón de rata alimentadas con dieta deficiente en Zinc.** Nidia Gomez, M.S.Ojeda, M.S.Gimenez

Departamento de Bioquímica y Cs.Biológicas. Universidad Nacional de San Luis.

El propósito de este trabajo fue estudiar el efecto de la deficiencia de zinc en el metabolismo de lípidos en pulmón. Se trabajó con ratas macho, cepa Wistar, las que se separaron en dos grupos: grupo I (1) fue alimentado con dieta deficiente en zinc (-Zn) y grupo II (2) con dieta standard suplementada con zinc (30mg/kg dieta)(Zn) durante 2 y 4 meses para ambos grupos. Los animales fueron sacrificados y los pulmones extraídos. Se extrajeron los lípidos totales y se determinaron por gravimetría. La separación de los diferentes lípidos se hizo por TLC en sílica G. Despues de 2 meses con dieta (-Zn) los lípidos totales y fosfolípidos no se modificaron en (1) con respecto a (2). Colesterol total (CT) 1.9 mg /gr tej.  $\pm 0.04(1)$ , 2.1  $\pm 0.02(2)$  p<0.01; colesterol libre(CL) 1.0  $\pm 0.09(1)$ , 1.6  $\pm 0.1(2)$  p<0.001; triglicéridos (TG) 99  $\mu\text{g}$  /gr tej.  $\pm 1.2(1)$ , 125.5  $\mu\text{g}$  /gr tej.  $\pm 1.5(2)$  p<0.001. CE 0.24 mg/gr tej.  $\pm 0.02(1)$ , 0.16 mg /gr tej.  $\pm 6.0 \times 10^{-3}(2)$  p<0.001. Despues de 4 meses con dieta (-Zn), los lípidos totales, fosfolípidos y triglicéridos no dieron diferencias entre los grupos (1) y (2). CT 1.5 mg /gr tej.  $\pm 0.03(1)$ , 1.8 mg /gr tej.  $\pm 0.03(2)$  p<0.001; CL 1.2 mg /gr tej.  $\pm 0.2(1)$ , 1.32 mg /gr tej.  $\pm 0.1(2)$ ; CE 0.3 mg /gr tej  $\pm 0.04(1)$ , 0.2 mg /gr tej.  $\pm 0.02(2)$  p<0.01. De estos resultados se puede ver que TG disminuyen a los 2 meses de ingesta de dieta (-Zn) pero que al aumentar el tiempo de ingesta esa diferencia desaparece. Colesterol total y libre disminuyen lo que podría afectar la composición de las membranas celulares. Si bien los fosfolípidos totales no se modifican, existen diferencias entre las diferentes especies de los mismos entre los 2 y 4 meses de ingesta. De todo esto se puede concluir que el efecto de la deficiencia de zinc en el metabolismo de los lípidos en pulmón de rata dependen del tiempo de ingesta y del tratamiento dietario.

**46. El ubiqinol incorporado a la membrana mitocondrial reacciona con el óxido nítrico para formar peróxido de hidrógeno.** F.J. Shöpfer, C.L. Lisdero, M.C. Carreras, P.V. Finocchietto, A. Boveris, J.J. Poderoso.

Lab. Metabolismo del Oxígeno, Htal de Clínicas, U.B.A. Buenos Aires.

El óxido nítrico (•NO) reacciona con el ubiqinol(QH2) produciendo anión nitroxilo y el radical semiquinona y en presencia de oxígeno, anión superóxido ( $O_2^-$ ) y su producto de dismutación, el peróxido de hidrógeno( $H_2O_2$ ). Nuestro objetivo fue demostrar que esta reacción tiene lugar en la membrana mitocondrial y que es responsable de la producción de especies reactivas del oxígeno. Se aislaron mitocondrias de hígado de rata y por sonicación partículas submitocondriales (PSM). Las mitocondrias fueron suplementadas con distintas ubiquinonas(Q-0,Q-2,Q-10) y se midió su incorporación, como la reducción de Q por la cade-

na de transporte de electrones a través del espectro de absorción. El agregado de •NO, indujo la reoxidación de QH2 e inhibió en forma dosis-dependiente el consumo de oxígeno mitocondrial y la actividad de la citocromo oxidasa, la que fue revertida con el agregado de 2-30  $\mu\text{M}$  Q-0 o Q-2. Concomitantemente, la producción mitocondrial de  $H_2O_2$  aumentó de 0.14 a 0.22 nmol.mín-1.mg prot-1. Además, el •NO disipó el potencial de membrana de mitocondrias y este efecto fue revertido en forma directamente proporcional a la producción de  $H_2O_2$ . Los resultados demuestran: 1. La reacción •NO-QH2 se produce en la membrana mitocondrial. 2. Los efectos del •NO sobre las mitocondrias son revertidos por el  $O_2^-$  producido por la reacción •NO-QH2. 3. Una de las funciones de la producción mitocondrial de  $O_2^-$  es la de controlar los efectos del •NO.

**47. Expresión de la Proteína Asociada a la Pancreatitis en un Modelo Experimental Inducido por Endotoxina.** Vaccaro MI, Dagrosa MA, Tiscornia OM, Lanosa G.

Dept. de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA, Buenos Aires.

El lipopolisacárido bacteriano (LPS), ha sido hallado en plasma durante la pancreatitis aguda. En páncreas de rata el LPS mostró inducir lesiones tisulares y alteración de la secreción enzimática. La proteína asociada a la pancreatitis (PAP) fue descripta como el más sensible marcador de pancreatitis aguda. El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión de PAP en páncreas, en el modelo inducido por LPS. A ratas Wistar de 180-200 g se les administró en forma intraperitoneal de 40 mg/Kg/24 h de LPS de *Salmonella typhi* o solución fisiológica apirógena. Se estableció el perfil electroforético de proteínas pancreáticas mediante gel de poliacrilamida-SDS 12.5%. Luego se investigó la expresión de PAP mediante Western blot. Los niveles de amilasemia fueron significativamente mayores en el grupo tratado que en el control (2712  $\pm 258$  vs. 1533  $\pm 87$  U/L, n=8, p<0.001). El patrón electroforético mostró un marcado aumento de la banda de 15 KDa en el modelo experimental. Los animales tratados expresaron PAP; no hubo expresión en los controles. Esta proteína aparece a las 12 h, siendo máxima a las 48 h y disminuyendo hasta no expresarse a los 4 días. Los resultados demuestran que el LPS indujo la expresión de PAP en páncreas y sugieren que éste estaría implicado en la fisiopatología de la pancreatitis aguda, siendo un potencial mediador del daño.

**48. Enzimas metabolizadoras de carcinógenos durante la regeneración hepática en ratas. Efecto de inductores.** C.Favre, Celina Scapini, JA. Monti, Cristina Carnovale, María C. Carrillo.

IFISE.-CONICET, Fac. de Cs. Bioq. y Farm.-UNR. Rosario.

En estudios previos observamos que luego de la hepatectomía parcial (HP), tanto las glutatión S-transferasas (GST) como algunas isoenzimas de P450 están disminuidas, mientras que otras como CYP1A1 y CYP2B1/2 no sufren modificaciones. En este trabajo se estudiaron las isoenzimas de P450, CYP1A1 y CYP2B1/2 y la familia GST en hígado de ratas regenerantes tratadas con inductores clásicos. Se

utilizaron 4 grupos de ratas Wistar machos: sham (SH) y HP tratadas con 3-metilecolantreno (MC, 20mg/Kg/día, i.p.) y SH y HP tratadas con fenobarbital (PB, 100mg/Kg/día, i.p.). A las 72h se determinó en fracciones subcelulares hepáticas: Actividad GST total citosólica; actividad EROD asociada a CYP1A1 (MC-inducible); actividad BROD asociada a CYP2B1/2 (PB-inducible); ensayos de Western Blot del patrón de subunidades de GST (Ya, Yb<sub>1</sub>/2, Yc, Yp) y del contenido de apoproteínas CYP1A1 y CYP2B1/2. No hubo diferencias significativas ( $p>0.05$ ) en las actividades EROD y BROD entre los grupos SH y HP tratados con cualquiera de los inductores (EROD: SH-MC: 66±4, HP-MC: 75±6; BROD: SH-PB: 0.47±0.08, HP-PB: 0.25±0.15 pmol/min/mg). La actividad GST se reestableció luego de la HP con ambos inductores (SH-MC: 1120±50, HP-MC: 1050±8 nmol/min/mg,  $p>0.05$ ; SH-PB: 1966±40, HP-PB: 1888±13 nmol/min/mg,  $p>0.05$ ). Sólo PB produjo cambios significativos ( $p<0.05$ ) en algunas subunidades de GST, siendo las densidades de banda en unidades arbitrarias para Yb<sub>1</sub>: SH-PB: 716±26, HP-PB: 900±22 y para Yc: SH-PB: 162±23, HP-PB: 263±8. CYP1A1 y CYP2B1/2 están preservadas durante la regeneración y responden normalmente a sus inductores. La familia GST parece modificar su respuesta a PB. Estos resultados son relevantes para la evaluación del riesgo carcinogénico en la etapa proliferativa de la regeneración.

- 49. n-3 AGPI e integridad hepática.** # Fernandez I., @ Novoa Bermudez MJ., # Pallaro A., # Slobodianik NH.

# Cátedra de Nutrición. @ Cátedra de Físicoquímica. Fac. Farmacia y Bioquímica. UBA. Buenos Aires.

Estudios preliminares demostraron que la desnutrición proteica severa al destete altera la maduración y proliferación celular tímica. La administración de una dieta de recuperación durante 9 días a base de caseína al 20% suplementada con 24 mg/día de Ácidos Grasos Poliinsaturados de la serie n-3 (n-3 AGPI) logró revertir dicho efecto. El objetivo del presente trabajo es analizar si la dosis de n-3 AGPI utilizada, compromete la integridad del tejido hepático. Ratas de la cepa Wistar con malnutrición severa al destete recibieron durante 9 días una dieta de caseína al 20% con (G1) y sin (G) el agregado de n-3 AGPI. Como grupo control (C) se utilizó animales bien nutridos de igual edad alimentados con dieta stock desde el destete. Al finalizar el período experimental y luego de 4 horas de ayuno las ratas fueron anestesiadas y se les extrajo el hígado. Se evaluó la integridad del tejido mediante 2 técnicas: substancias reactivas con Ac. Tiobarbitúrico (TBARS) y quimioluminiscencia iniciada con hidroperóxido de terbutilo (T-BOOH). No se observan diferencias significativas ( $p<<0.01$ ) ni en TBARS (G1: 0.74±0.22; G: 0.57±0.11; C: 0.76±0.22) ni en T-BOOH (G1: 36.52±10.71; G: 39.07±12.07; C: 35.54±9.41) en los grupos estudiados. Estos resultados demuestran que la administración de 24mg/día de n-3 AGPI no compromete la integridad del tejido hepático. Parcialmente financiado por UBA (FA-021).

- 50. Evaluación del sistema hepático destoxicificador de fase I en un modelo de estenosis parcial coledociana (EPC) en la rata.** Agüero, Rut M., Alvarez

María L. Trvojevich, R., Rodríguez Garay E A.  
IFISE-CONICET. UNR. Rosario.

Se analizó la actividad del complejo enzimático de oxidasa de función mixta por medio de la prueba *in vivo* de desmetilación de <sup>14</sup>C-aminopirina inyectada i.p. La velocidad de desmetilación de <sup>14</sup>C-aminopirina fue evaluada analizando la eliminación de <sup>14</sup>C en el aire espirado antes y a los 7, 14, y 21 días posteriores a la EPC. Antes de la EPC la eliminación de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> alcanzó un pico (5.88 ± 0.40 % de la dosis administrada/8 min) a los 27 ± 5 min. (n=11) y luego decreció monoexponencialmente (t<sub>1/2</sub>: 34.02 ± 3.6 min.). Luego de la EPC se observó a los 7 días, una disminución (34%) del pico de la curva con prolongación en el *t* de desmetilación (41 ± 4 min, n=7,  $p<0.05$ ). El análisis morfométrico efectuado a los 21 días mostró: a) 2 hígados con histología normal (desmetilación disminuida desde el 7mo al 21er. día), b) un hígado con importante proliferación ductular y fibrosis (desmetilación disminuida a los 21 días con oscilaciones intermedias) y c) 4 hígados con proliferación ductular moderada (tendencia a mejorar la desmetilación los días 14 y 21 sin retornar a sus valores controles). Los resultados indicarían que la función desmetilasa se halla alterada en los animales con EPC. La relación entre el grado de alteración histológica y la evolución posterior de la desmetilación, sugieren la existencia de mecanismos capaces de mejorar en algunos casos la capacidad metabolizadora hepática aunque sin retornar a valores previos.

- 51. Actividad glutation S-transferasa (GST) en ratas machos pretratadas con espironolactona (E).** Viviana Catania, M. Luquita, E. Sánchez Pozzi y A. Mottino.

IFISE (CONICET)-Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. Rosario.

Las GSTs (importante sistema de biotransformación de Fase II) comprenden homo y heterodímeros de subunidades denominadas Ya, Yb<sub>1</sub>, Yb<sub>2</sub>, Yc y Yp, entre otras. En este trabajo realizamos un estudio dosis-respuesta del efecto de E sobre la actividad GST (método de Habig et al., sustrato: 1-cloro-2,4-dinitrobenceno, CDNB) en hígado (H), yeyuno proximal (P) y colon (C) de ratas Wistar machos adultos. Los animales fueron tratados tres días consecutivos con E i.p. en dosis de 50 (E<sub>1</sub>); 100 (E<sub>2</sub>) y 200 (E<sub>3</sub>) µmole/kg peso/día. El grupo testigo (T) recibió el vehículo de E. Las actividades (nmoles de CDNB conjugado/min/mg proteína ± DS, n=4-5) fueron: HE<sub>1</sub>= 2920±113; HE<sub>2</sub>= 3038±312 y HE<sub>3</sub>= 4495±407, significativamente diferentes ( $p<0.05$ ) de HT= 1918±98; y PE<sub>1</sub>= 420±25; PE<sub>2</sub>= 470±36 y PE<sub>3</sub>= 495±39, significativamente diferentes ( $p<0.05$ ) de PT= 314±30. No hubo diferencias significativas en la actividad GST en C de los animales tratados con respecto a T a ninguna de las dosis estudiadas. Además evaluamos el contenido relativo de las distintas subunidades de GST por Western blot en E<sub>3</sub>. La densitometría de las bandas inmunorreactivas permitió establecer que, el aumento de actividad detectado en E<sub>3</sub>, fue a expensas de un aumento de la subunidad Ya en hígado y de las subunidades Ya e Yp en yeyuno. En C de E<sub>3</sub> no se observaron diferencias significativas con respecto a T para ninguna de las subunidades estudiadas. Conclusiones: 1- E muestra un efecto inductor evidente en hígado y yeyuno (que aumenta con la dosis), sin efecto significativo en colon. 2- E actúa induciendo selectivamente algunas subunidades de GST y este efecto es tejido-dependiente.

## Renal

**52. Papel de la dopamina (DA) en los cambios hemodinámicos renales inducidos por glucocorticoides.** F.R.Ibarra, J.Aguirre, Marta Barontini, Elvira E. Arrizurieta, Inés Armando.

Ctro. de Inv. Endocrin. (CONICET), Htal. de Niños R.Gutiérrez, Inst. de Inv. Médicas "A.Lanari", UBA. Buenos Aires.

Los glucocorticoides aumentan el filtrado glomerular, sin embargo se desconocen los mecanismos causantes del efecto. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la respuesta del sistema DOPA/DA renal en ratas Wistar tratadas con Dexametasona (Dx) de efecto prolongado. Los animales fueron colocados en jaulas metabólicas. Se les inyectó por vía i.m. Dx el 2º y 5º días (Dx2 y Dx5) con o sin la administración conjunta de haloperidol (H) i.p. un bloqueante inespecífico de receptores dopaminérgicos. A lo largo del estudio se evaluaron en orina de 24 hs: DOPA, DA y DOPAC, volumen (v) y Na+. En los días 2 y 5 se midieron también filtrado glomerular (FG) y flujo plasmático renal (FPR). La Dx2, respecto a los basales aumentó un 250% la DOPA ( $P < 0.05$ ) y no cambió la DA y el DOPAC. El v aumentó de  $10.6 \pm 3$  a  $21.4 \pm 1.9$  ml/d ( $P < 0.01$ ) y el Na+ de  $1.58 \pm 0.4$  a  $3.28 \pm 0.2$  mEq/d ( $P < 0.05$ ). El FG no cambió  $0.68 \pm 0.03$  vs  $0.70 \pm 0.04$  ml/min/100 g, y el FPR aumentó de  $2.2 \pm 0.05$  a  $3.8 \pm 0.06$  ml/min/100g ( $P < 0.05$ ). La Dx5 provocó cambios similares, pero aún mayores: incrementó en la DOPA de 400%, el v  $27.4 \pm 8.3$  ml/d, Na+  $4.92 \pm 0.6$  mEq/d, todos  $P < 0.01$ . Además, indujo un incremento del 320 % en la DA y del 350% en el DOPAC. También aumentó el FG a  $1.1 \pm 0.05$  y el FPR a  $3.9 \pm 0.05$  ml/min/100g,  $P < 0.05$ . El tratamiento con H no modificó los hallazgos de Dx2, pero abolió los provocados por Dx5 regresando a basales los valores de DOPA  $667 \pm 219$ , DA  $6665 \pm 813$  y DOPAC  $22351 \pm 2461$  ng/d, así como el v, Na+, FG y FPR. La Dx incrementó la perfusión renal en las dos situaciones. Mientras en la segunda es un mecanismo secundario a la inducción del sistema DOPA/DA renal, en la primera sería debido a otros factores hormonales.

**53. Crecimiento renal compensador (CRC) y sistema kalikreina-kinina (SKK) renal en ratas adultas. Relación con el sexo.** F.R. Ibarra, Elisabet Oddo, J. Toledo, R.S. Martin, Elvira E. Arrizurieta.

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

En los últimos años se incrementó la consulta de pacientes mujeres añas y con hipertensión arterial. Nuestro objetivo fue evaluar la respuesta hemodinámica, renal y del SKK en ratas Wistar de ambos sexos uninefrectomizadas (uNx). Se dividieron en dos grupos: GI con una uNx practicada a los 90 días de vida, y GII, control (C). Ambos grupos fueron estudiados a los 150 días de vida. Se midieron excreción urinaria de KK, filtrado glomerular (FG), presión arterial media (PAM) y CRC. El peso corporal fue mayor en machos (M) que en hembras (H), pero no varió entre uNx y C. El CRC fue de 85% en M pero solo del 65% en hembras uNx  $1.25 \pm 0.08$  vs C  $1.91 \pm 0.08$  g,  $P < 0.05$ . El FG fue de  $2.1 \pm 0.23$  ml/min en MC y  $1.59 \pm 0.13$  ml/min en HC. Los MuNx

mostraron un aumento del 75% respecto al C, mientras que en las HuNx el FG fue menor del 50 % del C respectivo  $P < 0.05$ . La excreción urinaria de KK por g de riñón fue de  $38.56 \pm 4.18$  en MC y  $33.03 \pm 4.07$  nkat/g/d en HC (NS). Los MuNx tuvieron una excreción menor ( $22.14 \pm 5.42$  nkat/g/d,  $P < 0.05$ ), en cambio las HuNx excretaron una cantidad no diferente a los C. La PAM fue menor en HuNx  $100 \pm 5.80$  vs HC  $119 \pm 1.66$  mmHg,  $P < 0.05$ . No hubo cambios en los M, C  $115 \pm 2.89$  y uNx  $103 \pm 8.8$  mmHg (NS). En las ratas hembras uNx el CRC, el FG y la PAM fueron menores que en los controles, mientras que la excreción de KK fue similar. Esto podría indicar un mecanismo vasodilatador compensador relacionado con el sexo, en una situación donde la masa renal y el FG están disminuidos.

**54. Mayores Niveles de Defensas Antioxidantes en Pacientes en Hemodiálisis Crónica Tratados con iECA.** Cavanagh, EMV de<sup>1</sup>; Carrasco, F<sup>1</sup>; Fraga, CG<sup>1</sup>; Inserra, F<sup>1</sup>; Ferder, L<sup>1</sup>; Scrivo, D<sup>2</sup>; Wassermann, A<sup>2</sup>.

Cátedra de Físicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. <sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Fundación Bar-Ilan. <sup>2</sup> CENHA, Buenos Aires.

Los iECA se usan en hipertensión, falla cardíaca, y en nefropatía diabética. El efecto no se conoce. Publicamos que los iECA incrementan el Glutathion, Glutathion Peroxidasa (GPx) y Superóxido Dismutasa (SOD) en ratones normales. Los pacientes en hemodiálisis tienen menores defensas antioxidantes. Evaluamos el efecto de los iECA en hemodializados. Medimos por espectrofotometría actividad de SOD eritrocitario (ER), GPx y Catalasa, y contenido de Glutathion ; y en plasma, por HPLC:  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -caroteno, y Ubiquinol-10. Evaluamos 22 pacientes renales, 11 control y 11 con enalapril 15 mg/día por 6 meses. Grupos comparables en edad, sexo, tiempo en diálisis y medicación. Resultados: Grupo Control : Glutathion :  $1.23 \pm 0.26$  mM ; GPx :  $4.33 \pm 0.24$  U/ml ER ; y SOD :  $69.2 \pm 3.2$   $\mu$ g/ml ER. Grupo Enalapril: Glutathion :  $3.08 \pm 0.90$  mM \* ; GPx :  $5.74 \pm 0.68$  U/ml ER \* ; y SOD :  $79.3 \pm 2.4$   $\mu$ g/ml ER \*. \* $p < 0.05$  Enalapril vs Control. Estadística : Test de Student. Catalasa fue similar en ambos grupos.  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -caroteno, y Ubiquinol-10 fueron : Grupo Control :  $20.6 \pm 1.2$   $\mu$ M,  $0.18 \pm 0.02$   $\mu$ M, y  $0.35 \pm 0.05$   $\mu$ M respectivamente ; y para Grupo Enalapril :  $24.6 \pm 2.5$   $\mu$ M,  $0.23 \pm 0.02$   $\mu$ M, y  $0.41 \pm 0.06$   $\mu$ M respectivamente. Sin diferencias significativas. Conclusiones : Los iECA incrementaron Glutathion, GPx y SOD. Estos resultados, son similares a los encontrados en animales, y abren la posibilidad de evaluar un nuevo mecanismo de acción de los iECA en esta población.

**55. Respuesta a sustancias vasodilatadoras de la vasculatura renal de animales colestásicos y en presencia de bilirrubina.** M.Mónica Elfás, Elena Ochoa(\*)

Farmacología, Facultad de Cs. Bioquímicas y

*Farmacéuticas. UNR. (\*) IFISE. CONICET. Rosario.*

En este trabajo se estudian las respuestas de la vasculatura renal previamente vasocontraída con fenilefrina (F) a nitroprusiato de sodio (NP) y carbacol (C), en riñones aislados y perfundidos de ratas normales perfundidos con bilirrubina (BNC) y de ratas con ligadura y sección de coledoco (LC), comparando los datos con riñones controles (CONT). Se agregan al medio de perfusión cantidades sucesivas de NP (10nmol-0.1mmol) o C(10nM-1mM) y se registran los cambios de presión de perfusión manteniendo el flujo de perfusión constante. Los resultados se expresan como % de relajación referido al valor de presión inducido por el agregado de F y se ajustan a una función hiperbólica con NP y a la suma de dos componentes con distinta afinidad para el caso de C. Los datos indican: a) Experimento NP : Relaj. máx. CONT : 49.5±2.3 (n=8) ; BNC (1 - 7μg/ml) : 34.0±1.5 (p<0.001)(n=5) ; LC : 45.5±5.7 (n=5). Los valores de DE<sub>50</sub>(μmoles) CONT : 1.26±0.07 ; BNC : 0.41±0.08 (p<0.001) ; LC : 0.34±0.03 (p<0.001). b) Experimento C : los datos controles (n=7) no difirieron de los obtenidos con los de los riñones provenientes de LC(n=6) y ambos grupos difirieron significativamente de los tratados con BNC (n=11), mostrando que BNC induce una menor capacidad de relajar en ambas fases, con mucho menor potencia. Estos datos indican un compromiso importante de la respuesta endotelial en presencia de BNC, mientras que no está alterada después de 4 días de LC ; por otro lado la relajación del músculo liso vascular está potenciada tanto en presencia de BNC como en LC.

**56. Interacción Factor Natriurético Atrial-Dopamina a nivel renal.** María C. Peruzzo, Alicia H. Correa, Andrea A. Muñoz, Gabriela E. Iribarren, B. E. Fernández.

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

Parte de los efectos diuréticos del factor natriurético atrial (ANF) se inhiben con bloqueantes de los receptores dopamínérgicos. Sugiriendo una interacción ANF-Dopamina (DA) a nivel renal. Se estudiaron los efectos del ANF(99-126) sobre la captación de <sup>3</sup>H-DA, <sup>3</sup>H-L-Dopa y sobre la secreción <sup>3</sup>H-DA en cortes de riñón de ratas Sprague Dawley, incubados *in vitro*. El ANF 10 y 100 nM incrementó la incorporación de DA (dpm/g x 105 (ES) (\*p<0.05) a los 30 min., en presencia de cocaína (para inhibir la captación neuronal), no observándose modificaciones a los 1, 10 y 20 min. de incubación. El ANF no alteró la captación de L-DOPA y la secreción de DA en ninguno de los tiempos estudiados.

Grupos	Corteza extrema	Corteza yuxtamédula	Médula
Control	4.00±0.29(19)	3.03±0.21(17)	1.34±0.13(11)
ANF 1 nM	3.61±0.33(8)	3.81±0.37(9)	1.58±0.23(7)
ANF 10 nM	5.14±0.37(8)*	4.29±0.36(7)*	2.40±0.27(6)*
ANF 100 nM	4.88±0.28(15)*	4.09±0.21(13)*	2.30±0.29(10)*

La liberación renal de DA mostró una curva típica de los tejidos extraneuronales. Los resultados sugieren que parte de los efectos natriuréticos del ANF a nivel de sectores tubulares en los que carece de receptores biológicos puede deberse al estímulo de los mecanismos de transporte involucrados en la captación de DA por el riñón.

**57. Polimorfismo inserción(I)/deleción(D) del gen de la enzima conversora de angiotensina (ECA) y nefropatía diabética (ND).** Estudio de una familia. Fraga A, Porto P, Pirola C, Martín R, Arizurieta E.

*Inst. Invest. Méd. Fac Med, UBA, Buenos Aires.*

Estudios del polimorfismo del gen de la ECA sugieren que el alelo D podría asociarse a proteinuria, nefropatía progresiva y aumento de sensibilidad a la inhibición de la ECA. Encontramos en 7 pacientes (ptes) diabéticos insulino-dependientes (DID) con ND, una frecuencia alélica de 28.5% inserción (I) y 71.5% delección (D) Distribución de genotipo: ausencia de II, 43% de DD (3 ptos), 57% de ID (4 ptos). Uno de ellos tiene una larga familia con progenitores no diabéticos y 8 hermanos, 4 DID, 3 varones y 1 mujer. Estudiamos en ellos, frecuencia alélica, distribución de genotipo y relación entre genotipo, DID y ND. Tres de los 5 hermanos no diabéticos (3 varones y 2 mujeres) son II y 2 ID, siendo la frecuencia alélica 80% I y 20% D. Uno de los DID es DD (25%) y los otros 3 ID (75%), siendo la frecuencia alélica 37.5% I y 62.5% D. El diabético DD de 44 años de edad y 17 de enfermedad, no presenta ND. Dos de los 3 DID ID, de 38 y 34 años de edad y 3 y 2 años de diabetes, tampoco presentan ND. La diabética ID restante, caso índice, de 29 años de edad y 14 de enfermedad, presenta ND progresiva. En esta familia los 4 DID presentan ausencia de genotipo II, alta frecuencia de alelo D y ND en sólo uno de ellos. Los hermanos no diabéticos presentan, en cambio, mayor frecuencia de alelo I.

**58. Enzimuria en ratas con nefropatía úrica.** Jorge Toblli; C. Nyberg; P. Pagano; M. Angerosa.

*Laboratorio de Medicina Experimental. Hospital Alemán. Buenos Aires.*

La excreción urinaria elevada de gammaglutamil-transpeptidasa ( $\gamma$ GT) y lisozima (Lz) ha sido asociada a daño tubular proximal (DTP). La nefropatía úrica (NU) produce daño tubulointersticial fundamentalmente medular y en menor escala cortical. El objetivo de este estudio fue demostrar cual de las enzimas mencionadas es más sensible como marcador de DTP en la NU. Se utilizaron machos SD (250-300g) G1 control (n=12) y G2 NU (n=12). El G1 con alimento estandar (Cargill, Argentina), G2 con un preparado a base de alimento estandar más ácido oxónico, inhibidor de uricasa hepática y ácido úrico (AU), durante cuatro semanas. Ambos G con alimento y agua "ad libitum". Se determinó en orina de 24hs. en período basal y al finalizar la cuarta semana  $\gamma$ GT, Lz y AU. Todos los animales se sacrificaron para estudio patológico previa extracción de sangre para creatinina y AU. La Lz se determinó por difusión radial (Kallested Diag. Inc. Sanofi Diag. Pasteur Inc. Chaska, MN), previo concentración urinaria con microcentrifuge filters, ultrafree-MC NMWL 5000. La  $\gamma$ GT por método SZASZ. No hubo cambios significativos en el período basal en las variables exploradas. Valores en orina el día 28 (media ± sem): AU (μg/g rat/día): G1 7.5 ± 0.6 ; G2 21.8 ± 3 (p=0.001);  $\gamma$ GT (mUI/g rat/día): G1 32.1 ± 3.8 ; G2 40.6 ± 2.9 (p=0.099); Lz (ng/g rat/día): G1 73.3 ± 3.1; G2 109.7 ± 10.5 (p=0.006). Conclusiones: 1) La Lz fue significativamente mayor en G2, mientras que  $\gamma$ GT no mostró mayores diferencias. 2) estos resultados sugieren una mayor sensibilidad de Lz para detectar DTP en este modelo de NU. •

- 59. Hiperlipemia e insulinemia en ratas con nefrectomía 5/6.** Jorge Toblli; G. De Rosa; P. Pagano; C. Nyberg; M. Angerosa; O. Mazza.

*Laboratorio de Medicina Experimental. Hospital Alemán. Buenos Aires.*

La resistencia insulínica ha sido vinculada con la dislipemia en la insuficiencia renal crónica. A su vez el depósito renal de lípidos contribuiría a la progresión de ésta. El motivo de este estudio fue evaluar los niveles séricos de insulina (INS) y lípidos en ratas con nefrectomía 5/6 (Nx5/6). Se utilizaron machos SD (280-300g), G2 Nx5/6 (n=15) y G2 Sham (n=15). Ambos G con agua y alimento estandar (18% proteínas) "ad libitum". Duración del experimento 24 semanas. Se evaluó presión arterial sistólica (PAS) por "tail cuff" mensualmente y se determinó: INS: colesterol (CLT); triglicéridos (TG); creatinina (Cr); proteinuria (PrU). La INS se determinó por RIA en fase sólida (Diagnostic Product Co. LA, CA). Finalmente se realizó estudio anatopatológico para evaluar: 1) Área glomerular (AG); 2) % glomeruloesclerosis (%GS). Los resultados en la semana 24 fueron (media ± sem): PAS (mmHg) G1 = 175 ± 3,6; G2 = 125,3 ± 0,9\*. Cr (mg/dL) G1 = 1,8 ± 0,07; G2 = 0,6 ± 0,02\*. PrU (mg/día) G1 = 152,8 ± 14,1; G2 = 5,1 ± 0,7\*. INS (μU/mL) G1 = 7,8 ± 1,7; G2 = 16,4 ± 2\*. CLT (mg/dL) G1 = 110,6 ± 7,8; G2 = 31,9 ± 1,5\*. TG (mg/dL) G1 = 119,6 ± 10,3; G2 = 28,4 ± 1,9\*. AG (μ²) G1 = 16163 ± 1321; G2 = 6467 ± 391\*. GS (%) G1 = 15,4 ± 2,8; G2 = 0,4 ± 0,2\*. (\*p<0,01). Conclusiones: 1) el nivel de CLT y TG fue significativamente mayor en G1 que también mostró mayor porcentaje de GS; 2) la INS de este mismo G fue menor sugiriendo que tanto la resistencia como la deficiencia insulínica contribuyan al desarrollo de la dislipemia en este modelo.

- 60. Inhibición de la unión del receptor de Vitamina D a su elemento respondedor en el gen de parathormona por ultrafiltrados urémicos.** Irina Mathov<sup>1</sup>, Lilian Plotkin<sup>1</sup>, Cecilia Sgarlata<sup>1</sup>, Juliana Leoni<sup>1</sup>, y C. Bogado<sup>2</sup>

<sup>1</sup> IDEHU-Cátedra de Immunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA), <sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Metabólicas, Buenos Aires.

La acción genómica de la vitamina 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> es mediada por la interacción de su receptor (VDR) con los elementos respondedores de la vitamina D (VDREs). Los pacientes con trastornos renales crónicos tienen deficiencia de vitamina D, lo que lleva a trastornos en el metabolismo fosfocalcico. Esta deficiencia no se corrige con la administración de vitamina D exógena. Con el fin de determinar si en el suero de los pacientes urémico existe algún factor capaz de disminuir la interacción del VDR con el DNA se cultivaron células osteoblasto-símil ROS 17/2.8 (osteosarcoma de rata), en presencia de ultrafiltrado de suero urémico. Se obtuvieron los extractos nucleares y se determinó la interacción del VDR con un oligonucleótido sintético marcado con [<sup>32</sup>P]dATP, correspondiente al VDRE presente en el gen de parathormona, mediante ensayos de EMSA. La presencia de vitamina en el medio de cultivo indujo un aumento de la unión del VDR al VDRE, mientras que el ultrafiltrado urémico en el medio de cultivo indujo una disminución de dicha unión. El agregado de vitamina D al medio contenido ultrafiltrado urémico no revirtió la disminución en la unión. Este dato justifica en parte la resistencia que poseen los pacientes renales crónicos a la acción de la vitamina D.

- 61. ¿Es igual la respuesta terapéutica de enalapril y losartan en nefropatía hiperoxalúrica?** Jorge Toblli; M. Angerosa; I. Stella; P. Pagano; C. Nyberg; L. Ferder; F. Inserra.

*Laboratorio de Medicina Experimental. Hospital Alemán & Fundación Bar Ilan. Buenos Aires.*

Ha sido bien demostrado el efecto renoprotector del enalapril (E) y losartan (L) en humanos y modelos animales. En este estudio comparamos los efectos de E y L en un modelo de daño tubulointersticial (TI) por hiperoxaluria (Hox) causada por etilenglicol (ETG). Se utilizaron machos SD (250-300g), G1 control (n=6); G2 Hox (n=6); G3 Hox + E (n=6); G4 E (n=6); G5 Hox + L (n=6); G6 L (n=6). G1 con agua común; G2, G3 y G5 con etilenglicol 1% (precursor de oxalato) en el agua. G3 y G4 con E 20mg/L en el agua., G5 y G6 con L 10mg/kg/día por sonda. Duración del experimento cuatro semanas. Al finalizar el experimento todos los animales fueron sacrificados para su estudio patológico donde se evaluó lesión TI según score también % de α-SMactina(%SMA). Resultados al final de la cuarta semana (media ± sem): Cl. Cr. (mL/min) G1 = 1,2 ± 0,07; G2 = 1,1 ± 0,08; G3 = 1,1 ± 0,07; G4 = 1,2 ± 0,08 ; \*G5 = 0,8 ± 0,07 ; G6 = 1,2 ± 0,05. Lisozimuria (ng/g rat/día) # G1 = 77 ± 3,8; G2 = 103,6 ± 4,2; ∞G3 = 82,7 ± 2,9; G4 = 76 ± 4 ; #G5 = 100 ± 5,2 ; G6 = 74,9 ± 3. Lesiones TI , G1 = 0,2 ± 0,1; G2 = 3 ± 0,2; \*G3 = 1,3 ± 0,2; G4 = 0,2 ± 0,1 ; #G5 = 3 ± 0,2 ; G6 = 0,1 ± 0,1. %SMA G1 = 0,5 ± 0,3; G2 = 13,5 ± 2,4; ∞G3 = 2 ± 0,4; G4 = 0,3 ± 0,2 ; \*G5 = 7,5 ± 0,9; G6 = 1 ± 0,3. ( $p<0,05$  \* vs. G2,G3 ; # vs. G3 ; ∞ vs. G2). #(p<0,01 G1 vs. G2,G3). ∞(p<0,01 G3 vs. G1,G2,G4; y G1 vs.G2). Conclusiones: L no presentó el mismo efecto renoprotector que E en este modelo.

- 62. Paradoja del calcio (Ca<sup>++</sup>) en riñón aislado y perfundido de rata.** Sara Weinschelbaum-Jairala<sup>\*</sup> y J. Elena Ochoa<sup>\*</sup>.

*IFISE (CONICET)- \*Consejo de Investigaciones, U.N.R. Rosario.*

La paradoja del Ca<sup>2+</sup>, conocida en fisiología cardíaca se discute también en fisiología renal y consiste en que si se perfunde un órgano con solución salina sin Ca<sup>2+</sup> no se observan alteraciones manifiestas que luego aparecen al reperfusión con la misma solución adicionada de Ca<sup>2+</sup>: se liberan al perfusato enzimas citosólicas (LDH). Se utilizaron ratas Wistar machos, cuyos riñones se perfundieron con Ringer Krebs (álbumina 3%) en dos períodos: en el primero sin Ca<sup>2+</sup> y en el segundo con Ca<sup>2+</sup>. Se evaluó liberación de LDH en ambos períodos, y al final del segundo, el contenido tisular de H<sub>2</sub>O, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en corteza renal. Presentamos sólo datos obtenidos en dos grupos: (n=6,c/u): a) con cambio de Ringer al empezar el 2do. periodo y b) sin cambio: -1er. período: LDH(U/l/g tejido seco): a) 10.52 ± 0.75 y b) 11.05 ± 1.08. NS - 2do. período: LDH; H<sub>2</sub>O (kg/kg tejido seco) y Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> (nmoles/kg tejido seco): a) 8.91 ± 0.50/ 4.03 ± 0.02/ 455 ± 11/ 179 ± 11. b) 23.30 ± 3.70\*\*/ 4.53 ± 0.12\*\*/ 614 ± 31\*\*/ 152 ± 4.\* \* p<0.05 / \*\*p<0.01 Conclusiones: De los resultados obtenidos en éstos y otros grupos surge: 1) que la paradoja del Ca<sup>2+</sup> se manifiesta en el riñón, 2) para ello es necesario que sustancias liberadas en el 1er. período estén presentes durante la reperfusión, 3) durante la reperfusión además de liberarse LDH se alteran los contenidos tisulares de H<sub>2</sub>O, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en corteza, 4) el fenómeno depende de la [Ca<sup>2+</sup>] en la reperfusión, 5) los resultados apoyan el concepto de no utilizar soluciones de "conservación" (Collins, Universidad de

Wisconsin, etc.) para perfundir el riñón transplantado al implantarlo.

- 63. Efecto del pH sobre los canales catiónicos inespecíficos (NSCC) de la membrana apical del sinciotrofoblasto de placenta humana a término, estudiado por reconstitución sobre bicapas planas.** Silvia González Perrett, Claudio Grosman e Ignacio L. Reisin.

Cátedra de Química General e Inorgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires.

Estudiamos el efecto del pH sobre la conductividad al K<sup>+</sup> de un canal catiónico inespecífico (NSCC) de la membrana apical de placenta humana a término por reconstitución sobre bicapas lipídicas planas (Grosman y Reisin, *Biophys.J.* 1996, 70: A199). Aquí describimos el bloqueo de la corriente de potasio por la disminución del pH. La conductividad unitaria del NSCC tiene una relación de permeabilidades  $P_{\text{Cl}^-}/P_{\text{K}^+}$  menor al 0,05. La elevación del pH de 7,2 a 8,0 aumenta la conductividad del NSCC mientras que la disminución del pH a valores próximos a 5,0 produce una disminución de la corriente y aumenta el ruido asociado a ella. La comparación de la curva I/V a pH ácido (4,8 - 5,0) respecto de la control (pH = 7,2) muestra que el valor de la amplitud depende de la concentración de protones y este efecto es voltaje dependiente. El análisis de este proceso indica que los protones bloquean la corriente de K<sup>+</sup> dentro de la vía conductiva; a una profundidad eléctrica d entre 0,50 y 0,60; por interacción con un sitio cuyo pKa es de 5,7. Parcialmente subsidiado por la UBA (FA126) y por la Agencia de Promoción de CyT (PICT-0257).

- 64. Manejo renal de electrolitos en ratas eSS.** S. Daniele, S. Arriaga, L.\* Morisoli, S.\* Martínez, S.\* Montenegro, M.C.\* Tarrés.

Cát. de Bioq. Clínica, Fac. Cs. Bioq. y Farm. Cát. Biología Fac. Cs. Médicas. U.N.R. \*CIUNR, Rosario.

A fin de caracterizar la función renal (FR) en una cepa de ratas macho eSS con diabetes espontánea, se midió la velocidad de filtración glomerular (VFG) y la excreción fraccional (EF) en orina de Na<sup>+</sup>, H<sub>2</sub>O, Ca<sup>++</sup> y P durante el período de envejecimiento y los resultados se compararon con los de las ratas Wistar (W) controles. Las W no mostraron modificaciones con la edad en ninguno de los parámetros medidos. A los 6 meses las ratas eSS no difirieron en FR con las W, salvo en un aumento en la diuresis ( $p < 0,001$ ). A los 12 meses, junto con la diferencia de diuresis se expresó una retención significativa de Na [EFNa: 6 vs. 12 meses:  $(7,5 \pm 4,6) \cdot 10^{-3}$  vs.  $(2,2 \pm 0,88) \cdot 10^{-3}$ ;  $p < 0,01$ ], con aumento en la EFCa [6 vs. 12 meses:  $(12,7 \pm 7,3) \cdot 10^{-3}$  vs.  $(52,8 \pm 24,3) \cdot 10^{-3}$ ;  $p < 0,001$ ] sin cambios en la VFG. Finalmente a los 21 meses la FR se deterioró globalmente (VFG:  $p < 0,001$ ) sin que en ese período las W se afecten. Se concluye que las ratas diabéticas eSS no difirieron de las W hasta los 6 meses. A los 12 meses se manifestó una disfunción en el manejo del Ca<sup>++</sup> asociado al Na<sup>+</sup>. A los 21 meses presentaron un deterioro de la FR no asociado solamente al proceso de envejecimiento, ya que el mismo no se comprobó en las W.

- 65. Efecto de la fibronectina (Fn) sobre la toxicidad glomerular inducida por cloruro mercuríco.** G. Girardi, D.E. Saball, M.M. Ellas.

Farmacología-Inmunología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR-CIUNR-CONICET, Rosario.

En trabajos anteriores sugerimos la existencia de un componente inflamatorio en la glomerulotoxicidad aguda inducida por el HgCl<sub>2</sub>. Objetivo: evaluar si la Fn es capaz de proteger los daños glomerulares inducidos por el HgCl<sub>2</sub> en ratas. Para ello se administró Fn (40 µg/kg p.c., i.v.) 30 min antes de la inyección de HgCl<sub>2</sub> (5 mg/kg, s.c.). 1 hora después se determinó urea plasmática, proteinuria y actividad mieloperoxidasa (MPO), lipoperoxidación (LPO) y ácido siálico (como medida de permselectividad glomerular) en glomerulos aislados (GA). Resultados: urea (mg/dl): C(n=6): 31±4; Hg(n=12): 82±5; Fn(n=5): 41±8, Fn+Hg(n=7): 55±5. Los grupos C y Fn no mostraron proteinuria, sí los grupos Hg y Fn+Hg; MPO(U/mg prot): C(n=5): 26 ±5; Hg(n=6): 53±7; Fn(n=5): 29±4; Fn+Hg(n=6): 34±8, LPO (nmoles MDA/mg prot): C(n=7): 32±6; Hg(n=10): 72±6; Fn(n=5): 28±5; Fn+Hg(n=6): 67±9; ác. siálico(µg/mg prot): C(n=5): 43 ±5; Hg(n=6): 5,2±0,9; Fn(n=5): 37±12; Fn+Hg(n=6): 3,8±1,2. Fn disminuyó la infiltración leucocitaria en GA del grupo Fn+ Hg. Se observó una protección parcial de Fn sobre los niveles de urea y ninguna protección sobre los daños glomerulares. Podemos concluir que si bien existe un compromiso inflamatorio en la glomerulotoxicidad inducida por HgCl<sub>2</sub> otros factores también serían responsables de los daños funcionales y estructurales glomerulares observados.

- 66. Compromiso glomerular en el tratamiento crónico con HgCl<sub>2</sub> en ratas.** G. Girardi, M. Salvarrey, M.M. Ellas.

Farmacología-Inmunología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR-CIUNR-CONICET, Rosario.

Previamente demostramos que los animales tratados con una dosis tóxica de HgCl<sub>2</sub> desarrollan un cuadro de insuficiencia renal aguda con daño glomerular caracterizado por alta infiltración leucocitaria y altos contenidos de fibronectina (Fn). Dosis subtóxicas de HgCl<sub>2</sub> inducen autoinmunidad en ratones y en algunas cepas de ratas. Objetivo: Estudiar el compromiso glomerular inmunológico en ratas Wistar tratadas con HgCl<sub>2</sub> en forma crónica. Se administró 0,5 mg/kg s.c. de HgCl<sub>2</sub> 3 veces por semana y los estudios se realizaron a los 7, 14 y 21 días. Se midió urea plasmática y contenido de mieloperoxidasa (MPO), Fn y depósitos de IgG en glomerulos aislados (GA) en ambos grupos experimentales (Hg y C). Se determinó anti-DNA nativo, anti-antígenos nucleares extrafribulares (ENA) y actividad total de complemento (AC) en plasma. Resultados: MPO y urea aumentaron en el tiempo, alcanzando valores máximos a los 14 y 21 días respectivamente (MPO(U/mg prot): C(n=5): 27±7, Hg<sub>14</sub> (n=5): 87±6, Hg<sub>21</sub> (n=6): 93±5; urea(mg/dl): C(n=5): 29±4, Hg<sub>14</sub>: 78±5, Hg<sub>21</sub>: 83±4. La AC mostró un aumento paralelo al de la Fn plasmática y a la aparición de depósitos glomerulares de IgG detectados por IF que alcanzaron un máximo al día 14 tendiendo a valores controles el día 21 (AC(UCH<sub>50</sub>): C(n=6): 7,5±1,3, Hg<sub>14</sub> (n=6): 7,2±0,6, Hg<sub>21</sub> (n=6): 43±5, Hg<sub>21</sub> (n=6): 17±2, Fn en el grupo Hg<sub>14</sub> aumentó 3 veces respecto del control). No se observaron cambios en los niveles de Fn en GA. Estos datos junto con la negatividad de los autoanticuerpos indicarían que el compromiso glomerular del HgCl<sub>2</sub> en forma crónica está asociado a un cuadro inflamatorio con depósito de IgG sugiriendo una respuesta autoinmune local.

**67. Alteraciones de la función renal en ratas tratadas con Vitamina D<sub>3</sub> y Nicotina.** V.M.C. García, E. Ochoa, M.M. Elías.

*Area Farmacología. Fac. de Cs. Bioq. y Farm. UNR. Rosario.*

En este modelo de calcinosis arterial (Henrion et al, J. Pharmacol. Exp. Ther. 260: 1; 1991) la función renal medida con técnicas de clearance presentó mayor VFG, Cl<sub>PAH</sub> y fracción de filtración, sin cambios significativos en los parámetros tubulares. El objetivo es estudiar con el modelo de riñón aislado y perfundido (RAP) posibles factores sistémicos y/o renales involucrados en los cambios de VFG y Cl<sub>PAH</sub> descriptos. Se trabajó con ratas controles (C), tratadas con Vitamina D<sub>3</sub> (300000 UI/kg, i.m.) más 2 dosis de Nicotina (25 mg/kg, p.o.) (DN), tratadas con Vitamina D<sub>3</sub> (D), y tratadas con Nicotina (N). El estudio se realizó 5 días después del tratamiento. Con el RAP la función renal del grupo DN mostró una disminución significativa en VFG (ml/min/gr, C: 0.30±0.03; DN: 0.19±0.03), sin cambios en el flujo renal efectivo (ml/min/gr, C: 18.2±1.3; DN: 22.0±3.7; C: n=4, DN: n=3). Las mismas alteraciones se observaron en el grupo D y no hubo cambios significativos en el grupo N. Se midió la respuesta de la vasculatura renal a noradrenalina sin observarse cambios significativos ni en resistencia vascular basal, ni en respuesta máxima, ni en CE<sub>50</sub>. (Respuesta máxima: variación de resistencia vascular, mmHg ml<sup>-1</sup> min, C: 23.2±1.8; n=4; D: 26.7±1.0; n=6; N: 22.4 ±0.8 n=6; DN: 25.2±1.8; n=3; CE<sub>50</sub> nmoles, C: 5.05±0.45; Resistencia basal mmHg ml<sup>-1</sup> min, C: 4.81±0.24). Dada la discrepancia entre la VFG medida in vivo y en RAP se propone una alteración en la permeabilidad de la barrera de filtración y la existencia de otras causas sistémicas que determinen in vivo un aumento en la presión efectiva de filtración y consecuentemente la hiperfiltración descripta.

**68. Transporte de ácido paraaminohipúrico (PAH) y actividad de enzimas apicales en riñón isquémico de rata.** Georgina Montagna, C.G. Hofer y Adriana M. Torres.

*Farmacología. Fac. Cs. Bioq. y Farm. UNR, Rosario.*

La isquemia renal causa alteraciones significativas en la estructura y función del túbulos proximal. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la isquemia sobre el transporte de PAH y sobre la actividad de enzimas apicales [G-glutamil-transferasa (GGT), Fosfatasa Alcalina (FAL) y 5'-Nucleotidasa (5'NT)] en vesículas de ribete en cepillo de corteza renal (VMRC). Se trabajó con ratas Wistar macho adultas. Se prepararon VMRC a partir de riñones controles (C, n=3) y de riñones extraídos luego de un período de isquemia (clampeo de arteria renal durante 50 minutos, Is, n=3). Se determinaron las actividades enzimáticas (mUI/mg Prot.) y los parámetros cinéticos de captación de <sup>3</sup>H-PAH usando la técnica de filtración rápida. El análisis de la captación de PAH reveló una disminución de la velocidad máxima de transporte en el grupo isquémico [Vmax(nmoles/15 seg/mg Prot.); C=214 ± 16 vs Is= 160 ± 2, P<0.05], no observándose variación del Km (mM) (C = 4.93 ± 0.19 vs Is = 5.49 ± 0.58). Las actividades enzimáticas disminuyeron luego de la isquemia. GGT: C= 48066 ± 2230 vs Is= 35043 ± 677, P<0.05; FAL: C= 3979 ± 232 vs Is= 2590 ± 148, P<0.05; 5'NT: C= 538 ± 36 vs Is= 304 ± 14, P < 0.05. Estos resultados demostrarían que la isquemia renal modifica las propiedades de transporte de PAH así como la actividad de enzimas

en membranas de ribete en cepillo. Estas alteraciones se adicionan a los daños funcionales previamente descriptos en la insuficiencia renal aguda inducida por isquemia.

**69. Efecto del suministro crónico de L-arginina (L-arg) en la hipertensión renovascular.** MI Rosón, N Spezzale, E Spezzale, LE Albornoz, GW Vega, MA Cannata, E Palumbo, A Ferrero, IJ de la Riva.

*Depto Fisiología. Fac Med. UBA. Buenos Aires.*

Los experimentos examinaron el suministro de L-arg en ratas SD 2R-2C. Se estudiaron dos grupos, sham (SH, n=20) e hipertenso (HT, n=14). Después de 4 semanas de la cirugía, parte de las ratas recibió L-arg (1.25 g/L) en el agua de bebida por 3 semanas (SHa e HTa); el resto se mantuvo como control (SHc e HTc). Se evaluó presión arterial indirecta (PA), nitratos+nitratos (NO<sub>2</sub>+NO<sub>3</sub>) en plasma, Tx<sub>B2</sub> y 6-ceto PGF<sub>1α</sub> en incubados de aorta abdominal: basal, estimulada con serotonina (5-HT) o éster de forbol (PDBu), contractilidad al CTK (60mM), 5-HT (10<sup>-6</sup>M), PDBu (10<sup>-6</sup>M) y la relajación a Acetilcolina (Ach 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>M); el espesor de la pared vascular se midió por histología. Resultados: PA HTc>SHc (P<0.001); HTa>SHa (P<0.001); NO<sub>2</sub>+NO<sub>3</sub> en plasma: tendencia al incremento (NS) en SHa e HTa; contractilidad: en HTa bajaron las respuestas contráctiles (K+ P<0.05, 5-HT P<0.05 y PDBu P<0.01) pero se mantuvo la hiperreactividad a 5-HT y PDBu de HT vs SH; la L-arg no modificó la menor relajación a la Ach del grupo HTa (P<0.001). Prostanoides: el grupo HTc mostró mayor disponibilidad de Tx<sub>B2</sub> por 5-HT (P<0.05) que desapareció en HTa; en el grupo HTa se observó mayor 6-ceto PGF<sub>1α</sub> estimulado con PDBu (P<0.01); estudio morfológico: significativo menor espesor de la pared arterial en el grupo SHa (P<0.002). Conclusiones: 1) la L-arg no modifica la PA ni el defecto de relajación de las HT; 2) probable efecto benéfico vascular de la L-arg en HTa al disminuir la tensión desarrollada por agonistas, normalizar el Tx<sub>B2</sub> por 5-HT e incrementar la 6-ceto PGF<sub>1α</sub> por PDBu.

**70. Sistema dopa/dopamina renal en ratas diabéticas.** Andrea Carranza, Liliana Karabatas, J.C. Basabe, Marta Barontini, Ines Armando.

*Centro de Investigaciones Endocrinológicas, CONICET, Hospital de Niños "R. Gutierrez", Buenos Aires*

Estudios en pacientes diabéticos tanto insulino dependientes como independientes sugieren que hay una producción disminuida de dopamina (DA) renal. El objetivo de este trabajo fue estudiar la producción de DA renal en ratas diabéticas por tratamiento con estreptozotocina (STZ). Se estudiaron ratas Wistar macho de 3 y 12 meses de edad. Los animales jóvenes se trataron con STZ (65 mg/kg; ip; n=4) o con vehículo (n=4) y los viejos con STZ (40 mg/kg; ip; n=5) o con vehículo (n=5) en el día 1. En los días 6, 13 y 22 post-tratamiento se recolectó orina de 24 h en jaula metabólica para determinación de Dopa, DA, ácido dihidroxifenilacetico (DOPAC) por HPLC-EC, Na<sup>+</sup> y glucemia. En las ratas jóvenes tratadas: las glucemias (p<0.01), la excreción de Na<sup>+</sup> (p<0.01) y el volumen urinario (p<0.01) fueron mayores que en los controles durante todo el estudio; la excreción de Dopa fue mayor (p<0.02) en los días 13 y 22; las excreciones de DA y DOPAC fueron similares a las de los controles en todos los días del estudio. En las ratas viejas tratadas: las glucemias fueron mayores (p<0.01) que en los controles durante todo el estudio; la excreción de Na<sup>+</sup> (p<0.02) y el volumen urinario p<0.02) fueron mayores en los días 13 y 22; la excreción de Dopa fue mayor (p<0.03) en el día 22;

las excreciones de DA y DOPAC fueron similares a las de los controles durante todo el estudio. Estos resultados muestran un incremento en la excreción de Dopa, probablemente debido a un aumento del filtrado glomerular, que no se acompaña por cambios significativos en la DA, sugiriendo que la síntesis de DA renal está disminuida en estos animales y que es regulada por factores diferentes de la disponibilidad de Dopa en el túbulo.

**71. Rol del citrato de potasio en la nefropatía por ácido úrico.** Jorge Toblli; G. DeRosa; N. Lago; M. Angerosa ; C. Nyberg.

*Laboratorio de Medicina Experimental. Hospital Alemán, Buenos Aires.*

La nefropatía por ácido úrico (NU) es causa de daño tubulointersticial (DTI). Por otra parte el uso de citrato de potasio (CiK) tanto en la litiasis oxalocalcica como en la úrica ha probado ser de utilidad terapéutica. El objetivo de este estudio fue evaluar el rol del CiK en un modelo de DTI por ácido úrico. Se utilizaron machos SD (250-300g) G1 (n=12) NU+CiK; G2(n=12) CiK; G3(n=12) NU. G1 y G3 alimentados con ac. oxónico (inhibidor de uricasa). G1 y G2 con CiK 2% en el agua de beber. Duración 4 semanas. Todos los animales fueron estudiados anatopatológicamente (MO, inmunomarcación y ME). Resultados día 29 (media ± sem): uricosuria ( $\mu\text{g/g rat/d}$ ) G1= \*22.7 ± 2.45 ; G2= 7.5 ± 0.53 ; G3= \*23.9 ± 1.26 ( $p < 0.01$  \*vs. G2). Citraturia ( $\mu\text{g/g rat/d}$ ) G1= \*94.2 ± 3.84 ; G2= \*91.5 ± 4 ; G3= 24.8 ± 1.27 ( $p < 0.01$  \*vs. G3). pH urinario G1= \*7.3 ± 0.2 ; G2= \*7.2 ± 0.12 ; G3= 6.5 ± 0.03 ( $p < 0.01$  \*vs. G3). %  $\alpha$ -SM actina G1= \*#2.5 ± 0.49 ; G2= \*0.1 ± 0.08 ; G3= 17.1 ± 2.92 ( $p < 0.01$  \*vs. G3; #vs.G2). Creatinina sérica (mg/dL) G1= \*0.62 ± 0.08 ; G2= \*0.5 ± 0.04; G3= 1.1 ± 0.06 ( $p < 0.01$  \*vs. G3). La MO evidenció gran deterioro TI en G3 con necrosis tubular e infiltración mononuclear. El G1 presentó mínimas lesiones. En la ME se observó en G3 mayor número de lisosomas, depósitos electrondensos y gran número de vacuolas contenido cristales, mientras el G1 presentó escasas lesiones. Conclusión: el tratamiento con CiK demostró efectivo en la protección del DTI en este modelo de NU.

**72. Respuesta vascular renal en ratas tratadas con aloxano.** V. García, E. Ochoa, M. Elías.

*Area Farmacología. Fac. de Cs. Bioq. y Farm. Universidad Nacional de Rosario. CONICET. Rosario.*

La vasculatura renal de ratas diabéticas (axoxano, 150mg/kg, s.c., 7 días después) presenta menor resistencia basal y menor respuesta máxima (Rmáx) a noradrenalina (NA). Al expresar la respuesta a NA como % de contracción se observó una disminución significativa en  $\text{DE}_{50}$  (nmoles, C: 2.03±0.44, A7: 0.84±0.18) sin cambios significativos en Rmáx (C: 297±18 n=8, A7: 286±26 n=6).

El objetivo es completar el estudio de la respuesta vascular considerando posibles alteraciones en la respuesta a vasodilatadores. Se trabajó con el modelo de riñón aislado y perfundido en ratas controles (C) y tratadas con aloxano (A7). Se mantuvo un flujo de perfusión constante en circuito cerrado y se provocó vasoconstricción con fenilefrina. Luego de la estabilización de la presión, se agregaron al perfusato dosis crecientes de nitroprusiato de sodio (NP) o de carbacol. En cada experimento se obtuvo una curva con una  $\text{Rmáx}$  expresada como % de relajación, y un valor de  $\text{CE}_{50}$ . En la respuesta a NP no se observaron cambios significativos (Rmáx, C: 63.3±6.2, A7: 78.0±5.0;  $\text{CE}_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ), C: 0.75±0.26, A7: 0.53±0.12; C: n=4, A7: n=4). En presencia de carbacol se observó una respuesta bifásica sin cambios significativos (Rmáx, C: 23.7±5.6, A7: 27.7±2.4;  $\text{CE}_{50,1}$  (nM) C: 0.058±0.022, A7: 0.065±0.021; Rmáx, C: 67.6±9.7, A7: 60.5±3.7,  $\text{CE}_{50,2}$  (nM) C: 0.16±0.017, A7: 0.11±0.041; C: n=5, A7: n=8). Concluimos que 7 días después de la inyección de aloxano la relajación independiente y dependiente de endotelio no condiciona la alteración vascular ya descripta. La menor resistencia basal y la mayor sensibilidad a NA continúan siendo objeto de nuestro estudio.

**73. Enalapril y excreción urinaria de lisozima en ratas hiperoxalúricas.** Jorge Toblli.; P. Pagano; M. Angerosa; C. Nyberg.

*Laboratorio de Medicina Experimental Hospital Alemán, Buenos Aires.*

La excreción elevada de lisozima (Lz) en orina ha sido tradicionalmente asociada con disfunción tubular. Trabajos de nuestro laboratorio demostraron en tejido renal protección del enalapril (E) en ratas con hiperoxaluria (Hox). El motivo de este estudio fue evaluar el efecto del E sobre la excreción de Lz en ratas con Hox. Se utilizaron machos SD (250-300g), G1 control (n=6); G2 Hox (n=6); G3 Hox. + E (n=6); G4 E (n=6). G1 con agua común; G2 y G3 con etilenglicol 1% (precursor de oxalato) en el agua. G3 y G4 con E 20mg/L en el agua. Duración del experimento cuatro semanas. Se evaluó presión arterial sistólica (PAS) por "tail cuff" período basal y al final de la cuarta semana. Se determinó Lz urinaria por difusión radial (Kallested Diag. Inc. Sanofi Diag. Pasteur Inc. Chaska, MN), previo concentración urinaria con microcentrifuge filters, ultrafree-MC NMWL 5000. En el período basal no hubo diferencias significativas en las variables exploradas. Al final de la cuarta semana (media ± sem): excreción de oxalatos ( $\mu\text{g/g rat/día}$ ): G1: 1.89±0.12; G2: 11.8±0.79; G3: 31.3±5; G4: 1.92±0.09. ( $p < 0.01$  = G1 vs. G2, G3; G4 vs. G2, G3. Lz urinaria (ng/g rat/día) G1: 7.4±3.8; G2: 103.6±4.2; G3: 82.7±2.9; G4: 76±4 ( $p < 0.01$  = G2 vs. G1, G3; G4). La PAS no presentó cambios con respecto al basal. Conclusiones: 1) la excreción de Lz fue menor en el grupo de ratas tratadas con E; 2) este hecho sugiere una protección a nivel funcional del E sobre el daño que produce la Hox, aun con una elevada excreción de oxalato en la orina.

**Endocrinología II**

- 74. Efectos diferenciales de los ovocitos sobre el crecimiento de células de la granulosa y la expansión del cumulus.** ML Fischman, GM Lanuza, y JL Barañao.

IBYME, FCV y FCEyN, UBA. Buenos Aires.

Experiencias recientes demuestran que los ovocitos, lejos de jugar un mero papel pasivo, controlan activamente el desarrollo folicular. Esta acción se ejerce fundamentalmente regulando la función de la población de células de la granulosa que constituyen el cumulus oophorus. El presente estudio tuvo como objetivo caracterizar el efecto mitogénico de ovocitos bovinos sobre células de la granulosa y diferenciar esta acción de la previamente demostrada sobre la expansión del cumulus. Como modelos experimentales se utilizaron células de granulosa de ratas inmaduras estrogenizadas, cultivadas en medio definido, y cumulus de ratón previamente liberados del ovocito por micromanipulación. Los ovocitos bovinos fueron aislados de folículos de 2-8 mm de diámetro y posteriormente denudados. Se encontró que la acción mitogénica de los ovocitos bovinos no es reproducible por agregado de medio condicionado (Control 900±125, Ovocitos 7900±500, MC 1570±130 cpm/célula de timidina incorporada) mientras que éste mantiene la capacidad de estimular la expansión del cumulus (Control: 0%, MC: 63%). Por otra parte, la acción mitogénica de los ovocitos decreció marcadamente luego de la maduración meiótica (Control 1000±60, Inmaduros 8800±600, Maduros 3100±200 cpm/célula) mientras que la acción sobre el cumulus no mostró cambios durante este proceso (Inmaduros: 93%, Maduros: 95%). Se determinó que la acción mitogénica de los ovocitos bovinos sería debida a un compuesto soluble no esteroide y la respuesta sería específica de células de granulosa ya que no se observaron efectos en otros tipos celulares tales como CCL64, Swiss 3T3.

- 75. Niveles séricos de inhibina B en la rata con orquitis autoinmune.**, María O Suescun<sup>1,2</sup>, Livia Lustig<sup>3</sup>, R Calandra<sup>2,4</sup>, N Groome<sup>5</sup> y Stella Campo<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>IMBICE, <sup>2</sup>Fac.Cs. Exactas, UNLP, <sup>3</sup>CIR, Fac. de Medicina, UBA, <sup>4</sup>IBYME, <sup>5</sup>Oxford Brookes University, <sup>6</sup>CEDIE, Htal R Gutierrez.

La Inhibina B es un péptido de origen gonadal que regula la secreción de FSH y que ha sido propuesto en el hombre como un parámetro de la funcionalidad de la célula de Sertoli. Previamente describimos que la inmunización en ratas con homogenato testicular y adyuvantes provoca en el 50 % de los animales, una orquitis autoinmune (OAE) con descamación severa del epitelio germinal, infiltrado intersticial, vacuolización del citoplasma de la célula de Sertoli y aumento de la FSH sérica. Estudiamos los niveles de inhibina B durante el desarrollo de la orquitis en relación a los cambios en la FSH y el peso testicular. El peso de la gonada disminuyó en el grupo con orquitis (L) y en un grupo con lesión unilateral (HL) respecto del control (C), inmunizado con salina y adyuvantes ( $p<0.01$ ). La FSH sérica se incrementó significativamente en ambos grupos con lesión con respecto al

grupo control (X + ES) L:  $19.8 \pm 3.74$ , HL:  $9.7 \pm 0.66$ , C:  $5.9 \pm 0.16$  ng/ml;  $p<0.05$ ). La Inhibina B se determinó en el suero por un enzima-inmunoensayo ultrasensible. Se observó una disminución significativa del péptido en los grupos lesionados respecto de C (L:  $40.2 \pm 4.60$ ; HL:  $140 \pm 10.6$ ; C:  $221.4 \pm 28.61$  pg/ml,  $p<0.05$ ). Se constató una correlación inversa entre Inhibina B y FSH  $r = -0.78$ ,  $p<0.02$ . Se concluye que la Inhibina B es un marcador sensible de la funcionalidad de la célula de Sertoli en el modelo de OAE.

- 76. Aumento de inmunoreactividad (IR) para Angiotensina II (Ang II) en el núcleo paraventricular (PVN) de ratas tratadas con DOCA que desarrollan apetito salino.** Flavia Saravia, Silvia García, Claudia Grillo y A.F. De Nicola.

IBYME-CONICET, Depto. Bioquímica Humana e Instituto de Invest. Médicas A. Lanari, Facultad de Medicina, UBA. Buenos Aires.

En trabajos anteriores demostramos que DOCA (10 mg/día/rata) administrada s.c. a ratas intactas en días alternos aumenta el apetito salino en un test de doble preferencia con oferta de agua y 3% NaCl. En dicho modelo observamos la disminución de IR para arginina vasopresina (AVP) con aumento significativo de su ARNm en la región magnocelular del PVN. Dado que la liberación de AVP es regulada positivamente por Ang II, el objetivo de este trabajo fue estudiar en este modelo animal los niveles de IR para Ang II, empleando un anticuerpo previamente caracterizado. Luego de realizar la inmunocitoquímica en cortes de cerebro se procedió a la cuantificación de IR por análisis densitométrico computarizado. En ratas DOCA se observó aumento del número de células Ang-IR (control:  $44.2 \pm 2$  vs. DOCA  $69.2 \pm 3.2$ ,  $p<0.005$ ), del área inmunoreactiva (control:  $139.8 \pm 5.9$  vs. DOCA:  $185.7 \pm 15.8$   $\mu\text{m}^2$ ,  $p<0.05$ ) y de la intensidad relativa al área (log de la intensidad de grises por área; control:  $0.42 \pm 0.01$  vs. DOCA:  $0.51 \pm 0.02$ ,  $p<0.05$ ). Las ratas no mostraron hipertensión al final del tratamiento (control:  $115 \pm 6$  vs. DOCA:  $125 \pm 2$  mm Hg, determinación en carótida) ni deshidratación. Los resultados apoyan resultados de la literatura respecto del aumento de Ang II en hipotálamo total de ratas con hipertensión DOCA/sal. Sin embargo, los datos en el PVN, sugieren que directamente o a través de cambios en AVP, Ang II podría estar involucrada en la inducción de apetito salino por mineralocorticoides en un estadio previo a la hipertensión.

- 77. Efecto del AMPc en la síntesis de ácido hialurónico y proteoglicanos por células 3T3-L1.** Cynthia Zizola, M. Sandoval, C. Molinari, J.C. Calvo.

IBYME, Buenos Aires.

Hemos presentado (SAIC 1996) la correlación entre la síntesis de ácido hialurónico (HA) y proteoglicanos (CSPG) y la diferenciación de preadipocitos 3T3-L1. En esta comunicación mostramos que, cultivando estas células en DMEM con 10% suero

fetal bovino y marcándolas con [<sup>3</sup>H]glucosamina y [<sup>35</sup>S]sulfato, se encontró que el principal estímulo que dio lugar a un incremento de HA (2,8 veces el control) y de CSPG (2,5 veces) fue debido al tratamiento con isobutilmetilxantina (IBMX) 0,5 mM, uno de los agentes clásicos utilizados para inducir la diferenciación de preadipocitos. La dosis mínima, tanto de dibutirilAMPc como de 8BrAMPc, para estimular la secreción de HA y CSPGs fue de 1mM (pmol HA/μg ADN: control (C)= 400,0 ± 14,1; dbAMPc= 958,3 ± 57,3 ; C = 68,3 ± 14,8 ; 8BrAMPc= 102,4 ± 1,9 ; pmol CSPG/mg ADN : C=127,3 ± 44,1; dbAMPc= 185,8 ± 82,7; C= 65,0 ± 10,6; 8BrAMPc= 115,5 ± 9,7). Las altas dosis de análogos de AMPc, necesarias para producir un efecto sobre la secreción de estas moléculas nos llevó a estudiar la combinación de IBMX y los nucleótidos. IBMX por sí solo fue capaz de llevar al máximo la síntesis de HA y CSPG. Esto nos indicaría que un nivel constante de AMPc durante más tiempo, por inhibición de la degradación del producido localmente y su compartimentalización, es necesario para la síntesis de estos componentes de la matriz.

- 78.** Los estrógenos aumentan la inmunoreactividad de los receptores de glucocorticoides (RGC) en hipocampo (HC) y la respuesta al estrés en animales seniles Mónica Ferrini, G. Piroli, Miriam Frontera, Andrea Falbo, Analía Lima y A.F. De Nicola.

IBYME y Cátedra de Biología Celular e Histología FFyB, UBA, Buenos Aires.

Los estrógenos ejercen importantes efectos neurotróficos y regulan el funcionamiento del eje SNC-hipófisis-adrenal (HPA). En el envejecimiento existen alteraciones neuroendocrinas, siendo el HC una de las áreas más sensible a este proceso. Nuestro objetivo fue estudiar si los estrógenos tienen efectos regulatorios sobre la respuesta al estrés y sobre la expresión de RGC en el HC de animales viejos ya que ambos parámetros se encuentran alterados. Ratas macho S-D jóvenes adultas (J) (3-4 meses) y viejas (V) (18-20 meses) se implantaron con un pellet de estradiol (E2) de 14 mg durante 6 semanas con sus respectivos controles (C). Utilizando el anticuerpo monoclonal anti RGC Mab 7 estudiamos la inmuno-reactividad de los RGC en distintas áreas del HC. Encontramos que en las áreas CA1, CA2 y subiculum existe un aumento de la densidad óptica en los VE2 cuando se los compara con los VC ( $p < 0.01$ ) y alcanzando niveles semejantes a los JC y JE2 (para CA2:JC:0.545±0.010; JE2:0.457±0.027; VC:0.379±0.020; VE2:0.533±0.038 unidades arbitrarias). Cuando evaluamos la respuesta al estrés por éter, encontramos que el corte de respuesta en los VE2 es semejante al de los JC y JE2 (JC:12.72±2.87; JE2:15.00±3.90; VC:31.47±2.87; VE2: 16.14 ± 3.60 μg corticosterona % ; VC  $p < 0.01$  vs JC=JE2=VE2 a las 2 hs post estrés). Conclusiones: E2 mejora la respuesta al estrés de animales seniles por re establecer los RGC lo que implicaría un aumento de la señal de feedback y una mejor regulación del eje HPA.

- 79.** Niveles séricos de prolactina durante la reducción progresiva de dosis de antipsicóticos típicos. N.M. Zelaschi, J.L. Rodriguez, F.M. Archuby, S.D. Panizzo, M.C. Chiodi.

Hospital Neuropsiquiátrico A. Korn. Facultad de Medi-

cina. UNLP, La Plata.

Introducción: anteriormente hemos presentado evidencia de niveles elevados de PRL en tratamientos crónicos con antipsicóticos típicos (APT) ó agentes bloqueantes dopamínérgicos D2. Aquí mostramos evidencia adicional de la evolución de la prolactinemia durante la reducción del tratamiento crónico con APT. Método: se estudió un grupo de 12 pacientes internados de sexo masculino y femenino, con diagnóstico de trastornos esquizofrenicos -Criterio DSM III R-. La PRL fue extraída en ayunas a las 8 a.m por venipunción y dosada por enzimoinmunoensayo y la dosis (d) de APT fue transformada en equivalentes de CPZ mg/d (CPZ equiv) APT usados: derivados de fenotiazinas y butirofenonas. Se aseguró una dosis constante durante al menos un mes previo al dosaje. Resultados: se expresan +/- 1 DS; Dosis inicial: 622.15 (623.44). Dosis Final: 410.57 (514.16). Nivel de PRL inicial: 133.50 (111.82). Nivel de PRL final: 56.80 (49.41). Período de seguimiento (rango en meses = 34 - 46). Con el fin de establecer la variación de la dosis y de la PRL a través del tiempo (t) se realizó un análisis de regresión lineal para cada paciente. Once de los casos (92 %) mostraron un decremento significativo de la dosis con una alta correlación entre (d) y (t), (valores de r entre 0.71 - 0.39); por el contrario no se observó correlación significativa de pendiente negativa para PRL (valores de r entre 0.03 - 0.80). Conclusiones: la falta de un significativo decremento en función del tiempo, de los valores de PRL, aún durante la reducción crónica efectiva del tratamiento, sugieren que los receptores D2 del sistema tuberoinfundibular podrían aún responder con una disminución de la inhibición dopamínérgica.

- 80.** Efecto de la separación temprana madre-cría sobre la actividad conductual, corticoadrenal y receptores β-adrenérgicos cardíacos en ratas con lesión de los núcleos anterodorsales talámicos. M Suarez, P Paglini, AR Fernández, JE Enders, N Perassi, JA Palma.

Instituto de Fisiología, Fac. Cs. Médicas, U. N.Cba. Córdoba.

Los núcleos límbicos anterodorsales talámicos (NADT) regulan la función adrenal y la depravación materna (DM) provoca modificaciones en el comportamiento y funciones orgánicas. En este trabajo se estudió la participación del NADT en la reactividad emocional (test de campo abierto), en los niveles de corticosterona plasmática (CP) y adrenal (CA) y su relación con la afinidad y densidad de receptores β-cardíacos, en ratas que sufrieron separación materna temprana. Los resultados obtenidos 29 días después de la lesión, indican que el 1er día de exposición al test las DM (separadas de la madre 4,5 hs durante las 3 primeras semanas de vida), disminuye la ambulación y alzamiento ( $p < 0.05$ ) en ratas falsamente lesionadas (control) y el alzamiento en las lesionadas ( $p < 0.05$ ). No se observan variaciones en la 2da exposición al test en ninguno de los índices evaluados: ambulación, alzamiento, defecación, autolimpieza en ratas con DM. Los niveles de CP aumentan en ratas controles con DM ( $p < 0.05$ ). La CA no se modifica en ratas controles y lesionadas con DM. La densidad y afinidad de receptores β-cardíacos se determinó en ventrículos con dihidroalprenolol tritiado con y sin propranolol 1 μM, y se observó un incremento significativo en la densidad de los grupos DM controles y lesionadas ( $p < 0.05$ ). Se concluye que la depravación materna afecta los patrones conductuales, la respuesta corticoadrenal y la densidad y afinidad de receptores β-cardíacos.

participando el NADT sólo en estos últimos parámetros. Subsidiado por SECyT-UNCba y CONICOR.

- 81. Papel de las fosfodiesterasas dependientes de cGMP sobre los niveles intracelulares de cAMP en adenohipófisis de rata.** M.O. Velardez, M.C. Díaz, A. De Laurentiis, D. Pisera, M. Lasaga, A. Seilicovich, B.H. Duvilanski.

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

El óxido nítrico (NO) aumenta la concentración intracelular de cGMP y disminuye la de cAMP en adenohipófisis. Nuestro objetivo fue investigar si las fosfodiesterasas (PDE) dependientes de cGMP están involucradas en el efecto del NO sobre la concentración intracelular de cAMP y la liberación de prolactina (determinados por RIA). EHNA (E,  $10^{-4}$  M), inhibidor de PDE estimulada por cGMP y HL-725 (HL,  $10^{-4}$  M) inhibidor de PDE inhibida por cGMP, bloquearon significativamente la inhibición inducida por nitroprusiato de sodio (NP, 0.5mM), sobre la concentración de cAMP (C:  $1.05 \pm 0.05$  nmol/ng proteína; NP:  $0.74 \pm 0.04$ ; E:  $1.14 \pm 0.07$ ; NP+E:  $1.92 \pm 0.12$ ; HL:  $1.51 \pm 0.09$ ; NP+HL:  $3.00 \pm 0.19$ ) y la liberación de prolactina (C:  $0.86 \pm 0.04$  ug/mg proteína; NP:  $0.66 \pm 0.05$ ; E:  $0.80 \pm 0.02$ ; NP+E:  $0.78 \pm 0.04$ , HL:  $0.93 \pm 0.6$ ; NP+HL:  $0.77 \pm 0.06$ ). Zaprinast, (Z,  $10^{-4}$  M) inhibidor de la PDE que hidroliza cGMP, potenció la inhibición inducida por NP sobre la concentración de cAMP (C:  $1.19 \pm 0.04$ ; NP:  $0.97 \pm 0.04$ ; Z:  $1.26 \pm 0.05$ ; NP+Z:  $0.65 \pm 0.11$ ). Estos resultados indican que la PDE para cAMP, estimulada por cGMP, participaría en la disminución de cAMP y prolactina inducida por NO.

- 82. Efectos neurotóxicos del tratamiento neonatal con monosodio glutamato sobre la actividad noradrenérgica hipotalámica.** Otoya R, Mampel A, Bregonzio C, Cabrera R, y Donoso A.

*Laboratorio de Investigaciones Cerebrales ( LINCE-CONICET) Mendoza.*

En estudios previos demostramos que la lesión neurotóxica hipotalámica, ocasionada por tratamiento neonatal con monosódico glutamato (MSG), producía modificaciones en el patrón de secreción de LH en la etapa puberal de vida. Dicha falla gonadotrófica podría ser consecuencia, entre otras cosas, de una inadecuada actividad noradrenérgica (NA) en el hipotálamo mediobasal (HMB). En el presente trabajo evaluamos la función NA de HMB en ratas púberes (40 días de edad) tratadas con MSG en la etapa neonatal de vida. El contenido total y la concentración de NA se encuentran aumentados en el HMB de los animales MSG ( $p < 0.05$ ;  $p < 0.001$ ). Por otro lado, cortes de HMB precargados *in vitro* con [ $^3$ H]NA fueron superfundidos y expuestos a veratridina (Ver), D-anfetamina (D-A) y ácido N-metil-D-aspartico (NMDA). La liberación de [ $^3$ H]NA inducida por Ver ( $7.5-10 \mu\text{M}$ ) fue mayor en los animales MSG ( $p < 0.001$ ), mientras que la respuesta a D-A ( $25 \mu\text{M}$ ) fue menor ( $p < 0.001$ ). La respuesta al NMDA ( $25-100 \mu\text{M}$ ) no se alteró. En experimentos adicionales estudiamos el sistema de recaptación de NA en secciones de HMB y en preparaciones sinaptosomales. En ningún caso se observaron diferencias en la capacidad de «uptake» de las terminales NA. En conclusión, el tratamiento neonatal con MSG altera la función NA en el HMB de ratas púberes. Esta disfunción no puede ser atribuida

a déficit en los sistemas de «uptake» de NA. Dichas alteraciones podrían ser responsables, al menos en parte, de la disfunción neuroendocrina presente en estos animales.

- 83. Efecto del colágeno IV sobre la secreción de prolactina por la adenohipófisis de rata.** Silvina Diaz, Valeria Rettori, Berta Swarcfarb y Berta Denduchis\*.

*CEFYBO-CONICET.\* C.I.R.Fac.de Medicina UBA. Buenos Aires.*

Por estudios inmunohistoquímicos se ha descripto la presencia de colágeno IV (C-IV) en la lámina basal y en las células endocrinas de la adenohipófisis (AH) de la rata. Nosotros previamente demostramos que la laminina ejerce un efecto fisiológico inhibitorio sobre la liberación de prolactina (PRL) de la AH de rata. El objetivo de este trabajo fue determinar por estudios «*in vitro*» el efecto del C-IV y del anticuerpo de conejo anti-colágeno IV (IgG-a-C IV) sobre la secreción de PRL de la AH de rata macho adulta. Para ello, se incubaron AHs con C-IV ( $10^{-11}$  a  $10^{-7}$  M), con IgG-a-C IV ( $10^{-6}$  a  $10^{-4}$  M) durante 3 hs. Como control, se utilizó medio solo o con IgG de suero normal de conejo (IgG-SN), y se midió PRL en el medio de incubación por RIA. El C-IV  $10^{-8}$  M ejerció un efecto inhibitorio sobre la liberación de PRL  $0.86 \pm 0.37$  mg/ml vs. control  $7.1 \pm 0.38$  µg/ml ( $p < 0.001$ ),  $n=8$  por grupo. La incubación con IgG-a-C IV  $10^{-4}$  M indujo un efecto estimulatorio  $9.83 \pm 0.72$  µg/ml vs. al medio solo  $5.5 \pm 0.71$  µg/ml o con el agregado de IgG-SN a la misma concentración  $5.43 \pm 0.19$  µg/ml, ( $p < 0.01$ ). Estos resultados, indican que el colágeno IV tendría al igual que la laminina, un papel fisiológico inhibitorio sobre la secreción de PRL por la pituitaria de rata.

- 84. Incremento de la actividad de proteínas tirosina fosfatases (PTP) por acción de ACTH.** Cristina Paz, Fabiana Cornejo Maciel, M. Victoria Guastavino, Cecilia Poderoso y E. J. Podestá.

*Dto. Bioquímica. Fac. de Medicina. UBA. Buenos Aires*

La regulación hormonal de la esteroidogénesis involucra procesos de fosfo-desfosforilación de proteínas. En este contexto se ha colocado énfasis en el estudio de serina/treonina quinasas o fosfatases, sin embargo no se conoce el papel de PTP y su regulación hormonal en estos sistemas. El objetivo de este trabajo fue investigar la regulación hormonal de PTP en la fracción soluble de zona fasciculata de glándula adrenal. La actividad de fosfatasa se midió determinando el nitrofenolato liberado (P.Cirri y col., 1995 BBActa, 1243:129) en ausencia o presencia de vanadato. ACTH (200 µg/kg de peso) incrementó significativamente ( $P < 0.05$ ) la actividad de PTP respecto de la inyección con salina (C) :  $34 \pm 6$  vs.  $21 \pm 5$  pmoles/30 min./µg de proteínas (ACTH vs. C). Los mismos resultados fueron observados por estimulación «*in vitro*» con ACTH (5 nM) u 8Br-AMPC ( $10^{-5}$  M) : C =  $25 \pm 8$ ; ACTH =  $39 \pm 5$ , ( $P < 0.05$ ); 8Br-AMPC =  $62 \pm 2$ , ( $P < 0.0001$ ). Estos resultados se confirmaron calculando también la actividad de fosfatasa sensible a molibdato y N-etilmaleimida. Estos datos muestran por primera vez que ACTH y AMPC promueven la activación de PTP en ZF de adrenal y se correlacionan con experimentos realizados en el laboratorio donde inhibidores de PTP bloquean la estimulación hormonal de la esteroidogénesis.

- 85. El óxido nítrico (NO) disminuye el Ca<sup>++</sup> intracelular en células de adenohipófisis.** M.O. Velardez, A. González Iglesias, S. Theas, A. Seilicovich, D. Becú de Villalobos, B.H. Duvilanski.

*Centro de Investigaciones en Reproducción. Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires e IBYME-CONICET, Buenos Aires.*

Previamente hemos demostrado que el sistema NO/cGMP inhibe la secreción de prolactina en adenohipófisis *in vitro*. El objetivo de este trabajo fue determinar si el NO afecta la movilización del Ca<sup>++</sup> intracelular. Para ello evaluamos los cambios en la concentración de Ca<sup>++</sup> intracelular ([Ca<sup>++</sup>]<sub>i</sub>) por el método fluorométrico con Fura-2 en células adenohipofisarias dispersas, utilizando nitroprusiato de sodio (NP) o glutatión-S-nítroso (GS-NO) como dadores de NO. El NP disminuyó la [Ca<sup>++</sup>]<sub>i</sub> en forma dosis dependiente. El área de la curva respecto del basal durante los primeros 24 segundos posteriores al estímulo fue: NP 0.1 mM: -16.2 ± 6.0; NP 0.25: -24.6 ± 7.0; NP 0.5: -23.1 ± 1.9; NP 1: -33.3 ± 3.7; NP 2: -69.0 ± 13.3; NP 5: -127.7 ± 12.0 (n=3). El GS-NO produjo una disminución similar. La respuesta a NP fue parcialmente bloqueada en ausencia de Ca<sup>++</sup> extracelular. Además el NP redujo la entrada de Ca<sup>++</sup> inducida por K<sup>+</sup>. Estos resultados sugieren que uno de los mecanismos por el cual el NO inhibe la secreción de prolactina involucraría a los canales de calcio sensibles a voltaje de la membrana plasmática, reduciendo la entrada de Ca<sup>++</sup> a la célula.

- 86. Expresión del gen de la enzima aromatasa cito-cromo P450 (P450<sub>AROM</sub>) en cráneofaringeomas.** S. Oknaian, N. Saraco, D. Diaz, F. Lubieniecki, A. L. Taratuto, M. A. Rivarola, A. Belgorosky.

*Lab de Investigación y Serv. Anatomía Patológica, Hospital Garrahan, Buenos Aires.*

Los cráneofaringeomas (CRAs) son histológicamente neoplasmas epiteliales benignos de la región selenar que frecuentemente exhiben un crecimiento local agresivo e invasivo, originados, al igual que la hipófisis normal, de la bolsa de Rathke. En pacientes menores de 12 años, nosotros hemos observado mayor frecuencia en varones (33 de un total de 45, p<0.05), mientras que en adolescentes entre 12 y 19 años de edad no hubo diferencia de sexo, sugiriendo un crecimiento tumoral más rápido en el sexo masculino. Por otra parte se ha descripto la expresión del gen del receptor de estrógenos en las células epiteliales de CRAs. Debido a que los andrógenos pueden actuar en el SNC por conversión local a estrógenos, el objetivo de este estudio fue evaluar la expresión del RNAm de la enzima P450<sub>AROM</sub> en CRA. La expresión de la P450<sub>AROM</sub> fue evaluada por RT-PCR en 3 CRAs, (2 niñas y un varón), en presencia de primers marcados con [<sup>32</sup>P], utilizándose la expresión de βActina como standard interno. Como control positivo y negativo se utilizó RNA total extraído de tejido placentario y de leucocitos respectivamente. La amplificación del fragmento de 293 pb correspondiente al cDNA de la P450<sub>AROM</sub> fue positiva en todos los casos. La especificidad del fragmento amplificado fue confirmada por digestión con las enzimas de restricción Hinf I y Rsa I. Estos resultados sugieren que la P450<sub>AROM</sub> podría estar presente en las células de los CRAs, abriendo la posibilidad de que las hormonas sexuales modulen el crecimiento tumoral y de que hubiera respuesta a manipulaciones hormonales terapéuticas.

- 87. El Azul de Metileno (AM) inhibe la actividad de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en el hipotálamo de rata.** A. Lomniczi, E. Cebral, G. Canteros, C. Mastronardi, V. Rettori, SM McCann.

*(CEFYBO-CONICET) Buenos Aires.*

En estudios recientes hemos descripto que en el curso de una inflamación sistémica hay una profunda inducción del mRNA de la iNOS en distintas estructuras del cerebro de la rata. Nuestro objetivo fue revertir, por medio de la administración sistémica de AM a través de un catéter yugular, la actividad de la iNOS en el hipotálamo medio basal (HMB) de la rata, inducida por lipopolisacáridos bacterianos (LPS). Se determinó la actividad NOS por el método de la [<sup>14</sup>C]-citrulina. La inyección i.v. de LPS (5 mg/kg) produjo un aumento significativo (p<0.001) de la actividad de la iNOS (de 71.6±7.9 a 278±20.3 fmoles de NO/min/HMB)(n=6) medida a las 4 hs de la inyección de LPS. Este incremento fue revertido en un 46% (150±18.6)(p<0.001) por la administración i.v. de AM (2.5 mg/kg)(n=5) a las 3 hs. desde la inyección del LPS. Paralelamente se encontró un aumento significativo (p<0.001) en los niveles de nitratos y nitritos plasmáticos por la acción del LPS (de 5.21±0.68 a 12.8±1.58 μM)(n=6). El AM no revirtió en forma significativa dicho incremento. Estos resultados demuestran que durante una inflamación sistémica aumenta la actividad de la iNOS hipotalámica y que la inhibición de la misma por medio del AM puede ser relevante como tratamiento de la sepsis.

- 88. Efecto de la endotoxina bacteriana (LPS) sobre la liberación pulsátil de gonadotrofinas *in vivo*.** Damián Refojo, Carlos Feleider, Pablo Arias, Jaime A. Moguilevsky.

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

Estados infecciosos cursan frecuentemente con alteraciones del eje gonadal. Evaluar el efecto de la administración intravenosa de LPS, sobre la liberación pulsátil de LH y FSH en ratas macho adultas orchidectomizadas fue el objetivo de esta investigación. 24 horas antes de los experimentos los animales fueron canulados. Se administraron 250 μg/kg de LPS o salina I.V. Se realizaron extracciones de sangre durante 10 min. durante 2 horas. Los parámetros de pulsabilidad fueron evaluados con el programa PC-PULSAR. El LPS inhibió la liberación basal y disminuyó los parámetros de pulsabilidad de LH afectando sólo la línea de base y la liberación promedio de FSH durante 2 horas.

Trat.	Frecuencia (pulsos/2hs)	Amplitud (ng/ml)	Liberación Promedio (ng/ml)	Línea de Base (ng/ml)
LH con	1.3 ± 0.3	17.2 ± 2.2	15.2 ± 0.75	13.83 ± .77
LPS	0.4 ± 0.2*	8.3 ± 6.7*	7.08 ± 1.11*	6.55 ± 0.74*
FSH con	0.7 ± 0.2	33.8 ± 2.7	73.1 ± 1.4	55.61 ± 3.73
LPS	1.0 ± 0.3	36.0 ± 3.6	61.3 ± 1.5*	43.78 ± 2.2*

\* p<0.05 vs con; \* p<0.01 vs con.

El LPS altera el eje reproductor afectando la liberación basal de FSH y la liberación basal y pulsátil de LH. Probablemente este efecto sea ejercido principalmente a nivel hipotalámico.

- 89. Ritmos diarios en hormonas hipofisarias y neurotransmisores en ratas inyectadas con adyuvante de Freund.** D.P. Cardinali, Laura Selgas, A. Arce, Ana I. Esquivino.

Dep. Fisiología, Facultad de Medicina, UBA y Dep. Bioquímica, Facultad de Medicina, Buenos Aires. Universidad Complutense, Madrid.

Se analizaron algunos de los cambios cronobiológicos en ratas precedentes al desarrollo de artritis experimental. En 6 intervalos horarios, se determinó, 3 días después de la inyección de adyuvante de Freund o veh, la concentración sérica de ACTH, PRL, GH y TSH por RIA y los niveles de noradrenalina (NA) y turnover de dopamina (DA) y serotonina (5-HT) en la eminencia media por HPLC. En los controles, los máximos en ACTH y PRL ocurrieron en la transición luz-oscuridad (2000 h) ( $F=10.1$ ,  $p<0.0001$  y  $2.55$ ,  $p=0.04$ , ANOVA de una vía) mientras que el de TSH se produjo en la tarde temprana (1600 h) ( $F=7.55$ ,  $p<0.0001$ ). No se observaron cambios diarios en GH. En ratas inyectadas con adyuvante las variaciones diarias de TSH fueron suprimidas, mientras que las de PRL y ACTH persistieron. El tratamiento aumentó los niveles de ACTH ( $F=34.4$ ,  $p<0.0001$ , ANOVA factorial) y PRL ( $F=15.6$ ,  $p=0.0002$ ) y disminuyó los de TSH ( $F=12.2$ ,  $p=0.0007$ ) y GH ( $F=18.5$ ,  $p<0.0001$ ). En los controles, los niveles de NA y turnover de DA y 5-HT hipotalámicos variaron diariamente con máximos a las 1600-2000 h (NA,  $F=3.87$ ,  $p=0.006$ ) y a las 0400 h (DA y 5-HT  $F=3.54$ ,  $p=0.01$  y  $F=3.14$ ,  $p=0.02$ ). La inyección de adyuvante redujo la amplitud de la variación diaria en NA, desplazó el máximo en turnover de DA hacia la transición luz-oscuridad y eliminó la variación diaria del turnover de 5-HT ( $p<0.001$ ). Estos resultados indican efectos significativos de la respuesta inmune en la fase temprana de la artritis experimental sobre el aparato circadiano.

- 90. La interleuquina-1 inhibe la secreción de LHRH inducida por NMDA. Efecto sobre la liberación de neurotransmisores aminoacídicos hipotalámicos.** Carlos Feleder, Damián Refojo, Silvina Nacht, Pablo Arias, Jaime A. Moguilevsky.

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

La interleuquina-1 (IL-1) altera el eje reproductor inhibiendo a las neuronas LHRH. Se investigó el efecto hipotalámico de esta citoquina sobre la liberación de LHRH y de aminoácidos excitatorios (glutamato (Glu), e inhibidores (GABA, glicina (Gly), taurina (Tau), estimulados por N-metil-D-aspartato (NMDA). El estudio se realizó perfundiendo fragmentos hipotalámicos (área medio basal y preóptica) de ratas macho adultas, con medio de Earle's, durante períodos de 30 min. El agregado de IL-1 (5 nM) inhibió la liberación de LHRH estimulada por NMDA (C:  $5.6 \pm 2$ ; NMDA:  $87.3 \pm 3.2$ ; IL-1+NMDA:  $3 \pm 1$  pg/ml,  $p<0.05$ ). Al mismo tiempo se detectó un aumento significativo en la liberación de GABA (C:  $82.1 \pm 9.5$ ; IL-1+NMDA:  $160.2 \pm 18.1$  % liberación basal,  $p<0.05$ ), Tau (C:  $68.9 \pm 9.1$ ; IL-1+NMDA:  $150.5 \pm 21.3$  % liberación basal,  $p<0.05$ ) y Gly (C:  $144.8 \pm 12.4$ ; IL-1+NMDA:  $259.7 \pm 38.7$  % liberación basal,  $p<0.05$ ). No se observaron cambios en la liberación de Glu. Estos resultados sugieren que la IL-1 inhibe la secreción de LHRH estimulada por NMDA, posiblemente incrementando la liberación de neurotransmisores inhibidores sin alterar la liberación de Glu. Estas modificaciones en la liberación de neurotransmisores pueden contribuir con el efecto supresor de la IL-1 sobre el LHRH estimulado por NMDA.

- 91. Cambios en los niveles de colesterol y fosfolípidos en ratas normales e hiperprolactinémicas inyectadas con melatonina.** Ana I. Esquivino, Carmen Agrasal, E. Velázquez, María A. Villanúa, D.P. Cardinali.

Dep. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Complutense, Madrid y Dep. Fisiología, F. Medicina, UBA, Buenos Aires.

En ratas hiperprolactinémicas existen cambios en el metabolismo del colesterol y lípidos totales, prevenibles por la inyección de bromocriptina. Ya que ha sido documentado un efecto depresor de la melatonina sobre los niveles de colesterol sérico en roedores, el objetivo de este trabajo fue examinar el efecto de distintas dosis de melatonina en ratas con transplante hipofisario productor de prolactina bajo la cápsula renal. Se transplantaron ratas en el día 30 de vida, las que en el día 60 recibieron 4 inyecciones s.c. de melatonina (25, 50 ó 100 g) o veh 2 h antes de la transición luz-oscuridad. Se midieron colorimétricamente los niveles de colesterol y fosfolípidos, y por RIA los de PRL, T3 y T4. En ratas con transplante hipofisario se observó una disminución en la concentración de colesterol libre (mg/dl) (transplante:  $37.1 \pm 2.6$ ; op.sim.:  $12.8 \pm 1.6$ ,  $p<0.01$ ) y un aumento en la de fosfolípidos (transplante:  $1.60 \pm 1$ ; op.sim.:  $3.20 \pm 3$ ,  $p<0.01$ ). En ratas con operación simulada el tratamiento con melatonina disminuyó significativamente el colesterol libre (veh:  $37.1 \pm 2.6$ ; 25  $\mu$ g:  $12.1 \pm 1.3$ ; 50  $\mu$ g:  $11.4 \pm 1.8$ ; 100  $\mu$ g:  $12.1 \pm 1.7$ ,  $p<0.01$ ) sin modificarlo en transplantadas. La melatonina también normalizó los niveles aumentados de fosfolípidos de ratas transplantadas y los aumentó en ratas controles. El tratamiento con melatonina redujo los niveles circulantes de PRL y T3 en ratas transplantadas y los de T4 en ratas controles ( $p<0.05$ ). Estos resultados indican que la melatonina contrarresta en parte los disturbios lipídicos en ratas hiperprolactinémicas.

- 92. Efecto de TNF- $\alpha$  sobre la liberación de prolactina.** S. Theas, A. De Laurentiis, D. Pisera, B. Duvilanski, A. Seilicovich.

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

TNF- $\alpha$  es una citoquina pleiotrópica que afecta la liberación de hormonas hipofisarias y actúa como un factor de crecimiento de células inmunes y no inmunes. Recientemente hemos demostrado que LPS estimula la liberación de TNF- $\alpha$  en cultivos de células adenohipofisarias e inhibe la liberación de prolactina. Dado que dicho efecto sólo es observado en presencia de estrógenos, estudiamos el efecto de TNF- $\alpha$  sobre la liberación de prolactina durante el ciclo estral. TNF- $\alpha$  (50 ng/ml) inhibió la liberación de prolactina luego de 8 h de incubación en cultivos de adenohipofisis de ratas hembras al azar e inhibió marcadamente la liberación de prolactina sólo en cultivos de adenohipofisis de ratas en proestro (C:  $576 \pm 38$  ng/ml, TNF- $\alpha$ :  $350 \pm 14$ ,  $p<0.001$ ) y estro (C:  $1056 \pm 58$ , TNF- $\alpha$ :  $676 \pm 32$ ,  $p<0.001$ ) pero no en diestro (C:  $580 \pm 34$ , TNF- $\alpha$ :  $526 \pm 10$ ). Además, TNF- $\alpha$  inhibió la incorporación de Timidina ( $^3$ H), disminuyó el número de células activas (método colorimétrico) y la concentración de ADN (método fluorométrico) de células adenohipofisarias, cuando éstas fueron incubadas en MEM-D-valina, un medio que inhibe la proliferación de fibroblastos. Nuestros resultados indican que el efecto inhibitorio de TNF- $\alpha$  sobre la liberación de prolactina estaría modulado por

el ambiente esteroideo, TNF- $\alpha$  tendría un papel inhibitorio sobre la proliferación de las células secretoras de la adenohipófisis.

**93. Efecto del NO en la liberación de LH-RH durante la maduración sexual en ratas hembra.** V Rettori, B Szwarcarb, S Carbone, D Rondina, P Scacchi y J Moguilevsky.

Departamento de Fisiología, Fac. de Medicina, UBA, y Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO), CONICET, Buenos Aires.

Hemos comprobado que existen cambios cualitativos y cuantitativos en la liberación de LH-RH durante la maduración sexual y que el NO controla la secreción de LH a través de LH-RH. Se investigó el papel de NO en el control de la liberación «in vitro» de LH-RH en hipotálamo medio basal (HMB) de ratas hembras prepúberes de 15 días (Prep), peripúberes de 30 días (Perip) y adultas castradas estrogenizadas 48 hs. antes del sacrificio. Los HMB (4-5 por grupo) fueron incubados en condiciones basales y en presencia de nitroprusiato (NP)  $5 \times 10^{-4}$  M, que es un liberador espontáneo de NO y de hemoglobina (HB)  $3 \times 10^{-4}$  M, quelante de NO. En ratas Prep el NP aumentó la liberación de LH-RH, expresada en pg/ml, ( $p < 0.01$ ), mientras que la HB bloqueó el efecto (C:  $1.1 \pm 0.25$ ; NP:  $2.26 \pm 0.34$ ; HB+NP:  $1.53 \pm 0.2$ ). En ratas Perip sin y con previo tratamiento estrogenético (E), el NP inhibió significativamente ( $p < 0.01$ ) la liberación de LH-RH (C:  $1.66 \pm 0.45$ ; NP:  $0.88 \pm 0.03$ ; HB+NP:  $1.57 \pm 0.48$ ; E:  $4.1 \pm 0.96$ ; E+NP:  $2.0 \pm 0.62$ ; E+HB+NP:  $5.0 \pm 0.9$ ). La misma acción inhibitoria fue observada en ratas adultas estrogenizadas (E:  $2.77 \pm 0.72$ ; E+NP:  $1.28 \pm 0.28$ ; E+HB+NP:  $2.36 \pm 0.71$ ). Similmente a lo ocurrido en el período Prep, en ratas Perip y adultas, la HB antagonizó el efecto del NP. Se concluye que el NO ejerce un efecto diferente sobre la liberación de LH-RH, según la etapa del desarrollo sexual y que el mismo podría relacionarse con la maduración del mecanismo feed-back positivo de los estrógenos.

**94.**

**Involución producida por levonorgestrel (LNG) y bromocriptina (BROM) en prolactinomas estrógeno-dependientes de ratas F344: efectos sobre el gen de galanina.** G. Piroli, Juliana Cassataro, Mónica Ferrini, Claudia Grillo, Paulina Roig y A.F. De Nicola.

IBYME y Depto. Bioquímica Humana, Fac. de Medicina, UBA, Buenos Aires.

La galanina (GAL) es un péptido que se sintetiza en hipófisis y libera prolactina. La expresión de GAL aumenta por estrógenos y mediaría el proceso proliferativo de lactotropos en prolactinomas experimentales (DES-T). Estos tumores se inducen por dietilestilbestrol (DES) en ratas F344. Previamente demostramos

que LNG y BROM antagonizan el crecimiento de DES-T. En esta oportunidad estudiamos los efectos de LNG y BROM sobre el ARNm de GAL en DES-T, determinado por hibridación in situ. Ratones macho F344 se trataron con DES (pellet s.c. 20 mg) y luego de dos semanas algunas recibieron LNG (pellet s.c. 15 mg) o BROM (pellet s.c. 15 mg); además algunos animales no tratados se usaron como controles (CONT). Los pesos hipofisarios fueron DES =  $47.84 \pm 1.83$  mg, DES+BROM =  $34.30 \pm 3.12$  ( $p < 0.01$  vs. DES), DES+LNG =  $31.63 \pm 1.88$  ( $p < 0.01$  vs. DES) y CONT =  $8.70 \pm 0.43$  ( $p < 0.001$  vs. todos los otros grupos). Las reducciones de peso hipofisario ejercidas por LNG y BROM se acompañaron de variaciones similares en la expresión del gen de GAL: DES =  $100.00 \pm 3.30$  unidades arbitrarias, DES+BROM =  $69.05 \pm 7.23$  ( $p < 0.01$  vs. DES), DES+LNG =  $54.30 \pm 0.74$  ( $p < 0.001$  vs. DES) y CONT =  $9.23 \pm 1.46$  ( $p < 0.01$  o menor vs. todos los otros grupos). Conclusión: la disminución de la expresión de galanina por LNG y BROM acompaña a los cambios observados en el tamaño de los tumores, apoyando la hipótesis de que la galanina es mediador de la proliferación de lactotropos inducida por estrógenos.

**95. Efecto de los sistemas GABAérgico y de aminoácidos excitatorios sobre la secreción de prolactina durante el desarrollo sexual en ratas macho.** P Scacchi, S Carbone, B Szwarcarb, D Rondina, S Nacht, O J Ponzo y J A Moguilevsky.

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA.

Hemos demostrado previamente que el sistema GABAérgico es liberador de prolactina (PRO) en ratas hembras prepúberes e inhibitorio en peripúberes y que los aminoácidos excitatorios tienen un efecto estimulante sobre esta hormona, en ambos períodos del desarrollo sexual. En el presente trabajo, se estudió el efecto de la administración de agonistas GABA-A:muscimol (M) (dosis: 2 mg/kg i.p.); GABA-B: baclofen (B) (dosis: 10 mg/kg i.p.); agonistas de receptores NMDA: N-methyl-D-Aspartato (NMDA) (dosis: 30 mg/kg i.p.); y de receptores no-NMDA: kainato (KA) (dosis: 2.5 mg/kg i.p.), sobre la liberación de PRO (ng/ml) en ratas macho pre y peripúberes (16 y 30 días, respectivamente). Se observó que a los 16 días, el M no modificó los niveles de PRO, mientras que B indujo un significativo incremento ( $p < 0.01$ ) (C:  $5.1 \pm 0.4$ ; M:  $5.8 \pm 0.5$ ; B:  $34.1 \pm 5.1$ ). En animales de 30 días ambos agonistas produjeron un descenso (C:  $10.2 \pm 2.54$ ; M:  $4.19 \pm 0.72$ ; B:  $4.45 \pm 0.38$ ). Por otra parte, NMDA y KA no produjeron cambios en la liberación de PRO en machos prepúberes, pero la disminuyeron ( $p < 0.01$ ) en animales de 30 días (C:  $10.4 \pm 1.8$ ; NMDA:  $3.7 \pm 0.3$ ; KA:  $4 \pm 0.4$ ). Se concluye que durante la maduración sexual en machos, los receptores GABA-B estarían involucrados en la acción estimulante sobre la liberación de PRO, en período peripupal y que los receptores NMDA y no-NMDA producen diferente efecto al observado en hembras.

## Neurociencias 1

96.

**Regulación de la proliferación de astrocitos en cultivo de ratones Wobbler, modelo animal de la Esclerosis Lateral Amiotrófica.** M. Claudio González Denisello, Sofía Lavista Llanos, Mónica Ferrini, Analía Lima, Alicia G. Roldán y A.F. de Nicola.

*IBYME-CONICET y Depto. Bioquímica humana, Facultad de Medicina, UBA, Buenos Aires.*

El ratón mutante Wobbler (Wr), modelo de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), posee degeneración de motoneuronas y pronunciada astroglisis en la médula espinal. Los mecanismos de proliferación se estudiaron en cultivos de astrocitos de médula espinal. La proliferación astrocítica (incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina cpm/10<sup>4</sup> células por 24 hs) fue 15 veces menor ( $p<0.01$ ) en astrocitos Wr ( $816 \pm 22$ , n=4) con respecto a controles ( $12284 \pm 1047$ , n=4), confirmado en 4 experimentos adicionales. Mientras que en controles, IL-1 (500 U/ml) ( $23220 \pm 1684$ , p<0.01), y corticosterona (CORT, 10<sup>-6</sup> M) ( $19070 \pm 883.2$ ; p<0.01) aumentaron la proliferación, solamente el TGF $\beta$  (20 ng/ml) fue activo en Wobblers ( $2202 \pm 22.14$ ; p<0.001) aunque no en controles ( $13582 \pm 1802$ ). La inactividad mitogénica de CORT *in vitro* no se correspondió con el alto nivel de receptores para glucocorticoides (GR) inmunoreactivos en astrocitos de Wr ( $1.3 \pm 0.11$  n=36) con respecto a controles ( $0.6 \pm 0.03$ ; p<0.001, n=47). Por otra parte, se determinó el área astrocitaria, la cual fue 10 veces mayor en astrocitos protoplasmáticos de Wr. En conclusión, el astrocito del Wobbler presentó: a) anomalías morfológicas; b) disminución de proliferación basal, insensibilidad a los agentes proliferativos usuales con respuesta anormal al TGF $\beta$ ; c) aumento de GR sin mediar efectos hormonales proliferativos. Los resultados sugieren una importante patología astrocitaria en la médula espinal del modelo murino de ELA (Subsidio por ME55 UBA; PIP 4103 CONICET).

97.

**Motoneuronas inmunoreactivas para los neuropéptidos oxitocina (OT) y vasopresina (AVP) en la médula espinal lumbar.** Susana L. Gonzalez, Flavia E. Saravia, Cristina Vega, Alejandro F. De Nicola, Héctor Coirini.

*Laboratorio de Bioquímica Neuroendocrina y Laboratorio de Neurobiología, IBYME - Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina - UBA, Buenos Aires.*

Fibras provenientes del núcleo paraventricular hipotalámico conteniendo neurofisinas han sido descriptas a nivel del núcleo del bulbocefálico de la médula espinal (SNB). Este núcleo interviene en la activación de músculos perineales bilaterales involucrados en el comportamiento sexual masculino. En el presente trabajo describimos la presencia de OT y AVP en los núcleos motores retrodorsolateral (RDLN), dorsolateral (DLN) y SNB por inmunocitoquímica y del mARN para cada uno de estos péptidos sobre las motoneuronas correspondientes por técnicas de hibridización *in situ* no isotópica. Se utilizaron cortes coronales de médula de ratas macho adulta Sprague-Dawley (n=4). El área

inmunoreactiva (IR) para OT en motoneuronas presentó el siguiente orden SNB>RDLN>DLN con densidad óptica (d.o.) de SNB=  $150 \pm 28$  y  $194 \pm 49$  en los otros núcleos. Los histogramas de frecuencia para el área IR de AVP mostraron un corrimiento hacia la derecha respecto de los de OT en el RDLN sin cambios en SNB y DLN (d.o.= 110-125). La relación de área IR OT/AVP para motoneuronas de igual tamaño fue SNB =  $1.6 \pm 0.3$  y DLN-RDLN =  $0.7 \pm 0.3$ . La presencia de IR para OT-mARN y AVP-mRNA se detectó en todas las motoneuronas con histogramas de distribución ligeramente desplazados hacia la derecha respecto de la IR de la proteína correspondiente. Esta es la primera descripción de la presencia en motoneuronas lumbares de OT y AVP y de sus mensajeros ribonucleicos. La localización en motoneuronas sugiere funciones moduladoras y/o tróficas para estos neuropéptidos. (financiado por ME-055, PIP-4103 y PICT-0410).

98. **Señales intracelulares acopladas al receptor (R) muscarínico colinérgico (M) en corteza frontal de ratones sometidos a hipoxia (HYP).** Tania G Borda, A M Genaro y G Cremaschi.

*CEFYBO-CONICET, Buenos Aires.*

Eventos bioquímicos están asociados con el daño cerebral durante la HYP. También se observó que la anoxia interfiere con la síntesis de neurotransmisores (acetilcolina). El objetivo de este trabajo fue estudiar las señales intracelulares (SI) acopladas al R M en corteza frontal cerebral murina luego de la HYP. En ratones CF1 sometidos a HYP durante tres días se estudió la acción del agonista de R M, carbachol (CARB) sobre SI. Se vio que los ratones HYP tenían una mayor producción de inositoles fosfatos (IPs) en respuesta al CARB que los normales (NORM) (IPs, área/mg: NORM, basal (B)  $24.9 \pm 3.3$ , CARB  $10^{-8}\text{M} = 53.3 \pm 4.7$ , HYP, B:  $12.7 \pm 1.9$ , CARB  $10^{-8}\text{M} = 68.6 \pm 5.2$ , n=5). La actividad basal de óxido nítrico sintasa (NOS) en animales HYP fue mayor que la de los NORM (pmol/ mg tejido: NORM=  $144 \pm 11$ ; HYP=  $215 \pm 19$ , n=6). CARB en forma concentración dependiente inhibió la NOS de los HYP y estimuló la de los NORM. También una translocación diferencial de PKC dependiente de la concentración de CARB, se observó en cerebro NORM (% citosol/membrana: NORM, B=70/30, CARB  $10^{-8}\text{M} = 60/40$ , CARB  $10^{-6}\text{M} = 33/67$ ) e HYP (B=89/11, CARB  $10^{-8}\text{M} = 61/39$ , CARB  $10^{-6}\text{M} = 41/59$ ). Estos resultados indicarían que la HYP conduciría a una mayor sensibilidad al CARB como un mecanismo compensatorio para disminuir la mayor actividad de NOS, probablemente debido a una menor actividad de PKC, la que a través de una mayor producción de NO, sería una de las responsables de los procesos neuropatológicos de la isquemia cerebral..

99. **Rol del óxido nítrico en el daño radioinducido sobre el sistema nervioso central (SNC) en desarrollo.** P. Gisone, D. Dubner, S. Michelin, M del R. Pérez.

*Autoridad Regulatoria Nuclear, Gerencia de Apoyo Científico, Buenos Aires.*

La radiosensibilidad prenatal del SNC es altamente dependiente del estado de desarrollo intrauterino, siendo máxima entre las semanas 8 y 15 de edad gestacional (e.g.). La generación de especies activas del oxígeno constituye el principal mecanismo indirecto de daño radioinducido en sistemas biológicos. El óxido nítrico (NO), implicado en procesos fisiológicos vinculados a la transducción de señales en el SNC, puede resultar altamente neurotóxico en ciertas situaciones patológicas. Con el objeto de estudiar el rol del óxido nítrico y su relación con el daño oxidativo radioinducido en SNC en desarrollo, se irradiaron lotes de ratas Wistar el día 17 de e.g. con dosis de 1Gy (Co60, tasa 0.23 Gy/minuto). Se determinó actividad de NO sintasa (NOS, pmoles citrulina/gr tej.) y DT-diaforasa (DT, nmoles/min/mg prot.) y concentración de lipoperóxidos (TBARS, nmoles/gr tej.) en homogenatos de cerebro fetal 1 h, 3 hs, 6 hs y 24 hs post irradiación (pi). Se observó un aumento en la actividad de NOS (control:  $9.8 \pm 2.1$ , 1 h pi:  $17.6 \pm 3.1$ , 3 hs pi:  $22.3 \pm 3.4$ , 6 hs pi:  $19.8 \pm 2.2$ , 24 hs pi:  $8.75 \pm 2.5$ ) y DT (control:  $69.54 \pm 7.1$ , 1 h pi:  $102.3 \pm 10$ , 3 hs pi:  $115.4 \pm 12.1$ , 6 hs pi:  $122.5 \pm 8.9$ , 24 hs pi:  $68.11 \pm 8.4$ ) que se correlacionó con un incremento en el nivel de TBARS (control:  $39.4 \pm 4.6$ , 1 h pi:  $35.22 \pm 6.4$ , 3 hs pi:  $58.3 \pm 6.7$ , 6 hs pi:  $47.35 \pm 2.9$ , 24 hs pi:  $38.3 \pm 5.3$ ). Estos resultados sugieren que el stress oxidativo y la neurotoxicidad mediada por el NO podrían ser fenómenos interdependientes en la generación de daño radioinducido en el SNC en desarrollo.

**100. Producción de NO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en enfermedad de Parkinson y Alzheimer. Estudio Comparativo.**  
Dres. EM Gatto, MC Carreras, N Riobó, Pargament G, R Allegri, JJ Poderoso.

*Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno. Htal. Clínicas. UBA, Buenos Aires.*

**Introducción:** El óxido nítrico (NO) ha sido implicado como uno de los mayores mediadores del daño neuronal en la Enfermedad de Parkinson (EP), sugiriéndose también su participación en los mecanismos de neurotoxicidad en la Enfermedad de Alzheimer (EA). **Objetivos:** Comparar la producción de NO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por polimorfonucleares (PMN) de pacientes con EP y EA vs. controles. **Métodos:** Se realizó aislamiento de PMN por técnica de gradiente de centrifugación de Ficoll Hypaque, en 21 pacientes con EP, 7 con EA y 17 controles sanos. Las determinaciones de NO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se efectuaron en condiciones basales, con PMA y fMLP, por método de oxidación de O<sub>2</sub>Mb a metMb y técnica fluorométrica respectivamente. **Resultados:** la producción de NO por PMN activados con PMA fue 61 y 57 % mayor en los pacientes con EP de novo y crónicamente tratados respecto de sus controles ( $0.74 \pm 0.08$ ,  $0.72 \pm 0.05$  vs.  $0.46 \pm 0.04$ ;  $p < 0.05$ ). En los pacientes con EA la producción de NO por PMN activados con PMA no evidenció diferencias respecto de los controles ( $0.67 \pm 0.04$  vs.  $0.67 \pm 0.04$ ). Sin embargo cuando se empleó fMLP la producción de NO en EA fue estadísticamente inferior respecto de los controles ( $0.25 \pm 0.02$  vs.  $0.39 \pm 0.05$ ;  $p = 0.013$ ). La producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en los pacientes con EP, presentó un incremento estadísticamente significativo sólo en el grupo de pacientes tratados ( $1.20 \pm 0.10$  vs.  $0.77 \pm 0.05$ ;  $p < 0.05$ ). No observándose diferencias respecto de los controles en los enfermos con EA. **Conclusiones:** los presentes hallazgos evidencian un rol del NO en ambas enfermedades. Las diferencias observadas permitirían especular sobre funciones regulatorias, mecanismos de transducción de señales o expresión y/o actividad de la óxido nítrico sintetasa disímiles en la EP y la EA.

**101. Protección antioxidante de la melatonina sobre el stress oxidativo inducido por el ácido δ-aminolevúlico.** Fernando Princ, A. Maxit, C. Cardalda, A. Batlle y A. Juknat.

*Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP) CONICET, Departamento de Química Biológica, FCEN / UBA, Buenos Aires.*

El ácido δ-aminolevúlico (ALA), un precursor del camino biosintético del hemo que se acumula en la Porfiria Aguda Intermittente, a pH fisiológico actúa como una fuente endógena de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas pueden provocar daño oxidativo a estructuras celulares. En este estudio investigamos la acción de concentraciones farmacológicas de melatonina (MEL) sobre el efecto ejercido por el ALA y sobre la biosíntesis de las porfirinas. Las incubaciones de cerebro de rata se realizaron con ALA (1,0mM) con el agregado de diferentes concentraciones de MEL (0,1-2,0 mM) o 2,0 mM de MEL con concentraciones variables de ALA ( $0.05 \pm 2.0$  mM) durante distintos tiempos ( $1 \pm 4$  hs). Se observó que la lipoperoxidación (LPO) inducida por el ALA disminuyó significativamente dependiendo de la concentración de MEL. La MEL 2,0 mM revirtió los valores de malondialdehído a niveles control. En incubaciones sin ALA, la MEL redujo marcadamente los niveles basales de LPO comparando con los correspondientes controles. La captación de ALA y la acumulación de porfirinas aumentaron en las incubaciones con 1,0-2,0mM de ALA durante 4 hs en presencia de 2,0mM de MEL. Estos datos indican el compromiso de las ROS promovidas por el ALA en el daño a las enzimas relacionadas a la biosíntesis del hemo, y además proveen evidencias del rol protector de la MEL contra el daño oxidativo inducido por el ALA, teniendo en cuenta sus propiedades antioxidantes y scavenger de radicales libres. En este punto es interesante considerar el desarrollo de una terapia para los pacientes con PAI empleando MEL sola o en combinación con los tratamientos convencionales.

**102. Insula: superficie, asimetría y lateralidad hemisférica** A. Merlo, E. Albanese, E. Gómez, T. Mascitti, A. Di Rienzo, R. Román, J. Miño, A. M. Albanese.

*Facultad de Medicina. Universidad del Salvador. Fac. de F. y Bioquímica y Fac. de Medicina. UBA. Fundación Antonio Di Rienzo, Buenos Aires.*

No hallamos en la bibliografía estudios sobre superficie, y lateralidad de la insula en un mismo grupo de cerebros. Objetivo: determinación de la asimetría y lateralidad hemisférica de la superficie cortical (expuesta y profunda) total (T), anterior (A) -correspondiente a la mitad anterior de su eje anteroposterior- y posterior (P) de la insula. Se midieron las superficies según nuestro método, utilizando registros coronales de resonancia magnética cada 0.2 cm de 18 controles femeninos, diestras (edad 19-22 años). Las superficies en cm<sup>2</sup> (media ± ES) de T, A y P son para el hemisferio izquierdo y derecho:  $12.36 \pm 0.48$  y  $10.84 \pm 0.39$  ( $p < 0.05$  ANOVA);  $7.67 \pm 0.27$  y  $6.81 \pm 0.26$  ( $p < 0.05$  ANOVA);  $4.69 \pm 0.25$  y  $4.03 \pm 0.17$ . Para asimetrías del 5% o más no se observan casos con lateralidad derecha en T y A donde en el 56% de los casos (31-78% para límites de confianza del 95%) es izquierda. En P el 61% de los casos (36-83% para límites de confianza del 95%) presentó lateralidad izquierda y sólo el 6% derecha. Habiéndose

relacionado a la insula anterior con funciones del lenguaje es relevante su lateralidad morfológica.

**103. Variante genética Met146Leu de Presenilina 1 causante de Enfermedad de Alzheimer (EA) de inicio precoz.** María Inés Prat., Laura Morelli., C. Mangone,\* EM Castaño.

*IIDEHU-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA. \* Servicio de Neurología Hospital Santojani. Buenos Aires.*

El 70% de los casos de EA familiar de inicio precoz se relacionan con mutaciones en el gen de Presenilina 1 (PS1), ubicado en el cromosoma 14. Estas sustituciones se encuentran principalmente en los exones 5 y 8, que codifican la región II transmembrana y el asa hidrofílica VI respectivamente. El pedigree argentino (AR1), previamente descripto por nosotros, no presentó mutaciones en los exones 15 y 16 del gen del precursor amiloide  $\beta$ . El objetivo de este trabajo fue detectar la mutación patogénica en el gen de PS1. A partir de DNA de cerebro de una paciente con diagnóstico anatómico patológico de EA y del DNA extraído de sangre periférica de otros miembros de esta familia, se amplificó, mediante PCR, un fragmento de 190 pares de bases correspondiente al exon 5. Este producto fue secuenciado y analizado por RFLP utilizando la enzima *BspH*I. Los resultados mostraron una mutación puntual ATG  $\rightarrow$  TTG en el codón 146 causante de la sustitución de metionina por leucina (Met146Leu). Dicha mutación segregó con la enfermedad en 4 miembros de 2 generaciones. Aunque esta sustitución aminoacídica fue descripta en dos pedigríes italianos, el cambio de A  $\rightarrow$  T en la primera posición del aminoácido 146 representa una nueva mutación indicando que el pedigree AR1 tiene un fundador genético diferente.

**104. Neuroesteroidogenesis en el SNC de las aves en desarrollo.** Pignataro<sup>1</sup>, A. Colman Lerner<sup>2</sup>, L. Barañao<sup>2</sup> y S. Fiszer de Plazas<sup>1</sup>.

*<sup>1</sup>Inst. de Biología Celular y Neurociencias, UBA e <sup>2</sup>Inst. de Biología y Medicina Experimental, UBA-CONICET, Buenos Aires*

Estudios en mamíferos revelaron que ciertos esteroides con estructura de pregnano  $5\alpha$  ó  $5\beta$ -reducido y  $3\alpha$ -hidroxilado, son capaces de modular positivamente al receptor GABA<sub>A</sub>, resultando inactivos los isómeros  $3\beta$ -hidroxilados. En el SNC de las aves esta modulación es mayor en estadios tempranos del desarrollo. Estos datos nos llevaron a estudiar su síntesis en el SNC de las aves en desarrollo y sus efectos *in vitro* sobre la unión de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam ([<sup>3</sup>H]FNZ). A tal fin, se incubaron lóbulos ópticos en distintos estadios del desarrollo, en presencia de [<sup>14</sup>C]progesterona (P<sub>4</sub>). Los derivados fueron resueltos por cromatografía en capa delgada y autoradiografía. La unión de [<sup>3</sup>H]FNZ a membranas sinápticas se realizó mediante la técnica de filtración. La P<sub>4</sub> fue convertida a derivados  $5\beta$ -reducidos los cuales fueron mayoritariamente convertidos a un derivado  $3\beta$ -hidroxilado ( $5\beta$ -pregnan- $3\beta$ -ol-20-ona) en estadios tempranos del desarrollo (días embrionarios 11 a 16). Por otro lado, la  $5\beta$ -pregnan- $3\beta$ -ol-20-ona produjo una potenciación concentración-dependiente de la unión del [<sup>3</sup>H]FNZ con  $EC_{50}$  de  $0.195 \pm 0.049$ ,  $0.101 \pm 0.017$ ,  $0.147 \pm 0.009$  y  $0.569 \pm 0.114 \mu M$  y  $E_{max}$  de  $22.37 \pm 1.57$ ,

$23.67 \pm 4.02$ ,  $29.01 \pm 1.08$  y  $15.11 \pm 2.67\%$  en los días embrionarios 11, 14, recién nacido y adulto, respectivamente. La síntesis de  $5\beta$ -pregnan- $3\beta$ -ol-20-ona en el lóbulo óptico en desarrollo y sus efectos modulatorios sobre el receptor GABA<sub>A</sub> sugerirían un rol funcional de este esteroide durante el desarrollo.

**105. Efecto fundador en población Fra-X argentina.** G<sup>1</sup> Bonaventure, M Torrado<sup>2</sup>, M Witis<sup>1</sup>, C Barreriro<sup>2</sup>, L Chertkoff<sup>1</sup>.

*Laboratorio de Biología Molecular<sup>1</sup>, Servicio de Genética<sup>2</sup>, Hospital de Pediatría "JP Garrahan", Buenos Aires.*

Estudiar el origen del síndrome de Fragilidad del cromosoma X tiene como objetivo comprender los mecanismos involucrados en los fenómenos de anticipación (expansión de repeticiones cortas en tandem, STRs). Estudios de asociación utilizando microsatélites en diferentes grupos étnicos sugieren la existencia de cromosomas con predisposición a la inestabilidad de sus secuencias repetidas. En la búsqueda de cromosomas fundadores en la población argentina fueron analizados los microsatélites FRAXAC1 y DXS548S en 168 cromosomas normales y 42 provenientes de familias Fra-X. Los microsatélites fueron amplificados por PCR, sus productos sometidos a PAGE en condiciones desnaturizantes y revelados por autoradiografía. El número de haplotipos (FRAXAC1-DXS548S) presentes en población normal fue de 7, mientras que los presentes en cromosomas Fra-X fueron 9. De estos últimos los alelos 154-194 ( $P < 0.005$ ), 158-194 ( $P < 0.0001$ ), 158-204 ( $P < 0.015$ ), 158-206 ( $P < 0.01$ ) presentaron desequilibrio de ligamiento respecto de los controles. Estos haplotipos en su conjunto representan el 76,2% de los cromosomas Fra-X (vs. el 58,3% en población control), y conciden, en su mayoría, con los de diferentes poblaciones estudiadas. Estos resultados apoyan la teoría de un efecto fundador como origen de estos cromosomas, así como el de su participación como generadores de nuevos casos.

**106. Receptores glutamatérgicos del núcleo accumbens en la rata: papel en las conductas inducidas por la novedad.** Alvarez E.O. y Ruarte M.B.,

*UNIFCO, Cátedra de Farmacología y Física Biológica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza.*

El núcleo accumbens es conocido como un regulador de la expresión motora en la rata. En este trabajo se trató de evaluar el papel del ácido glutámico (MSG) en esta estructura sobre la expresión de conductas inducidas por ambientes novedosos. Se trabajó con ratas macho adultas, implantadas en el accumbens con cánulas de microinyección. Después de la operación (72 hs), grupos de animales se inyectaron con salina o MSG con o sin la administración de los antagonistas AP3 (metabotrópico), AP7 (NMDA) y CNQX (Kainico). Como ambiente novedoso se usó un "holeboardz" modificado. Los resultados mostraron que la administración de 10 nmol de MSG no afectó las actividades motoras horizontales y ambulatorias pero inhibió significativamente la actividad no ambulatoria ( $731 \pm 33$  cuentas vs  $823 \pm 53$ ; MSG vs SAL,  $p < 0.05$ ), la frecuencia vertical ( $10 \pm 2$  vs  $15 \pm 2$ ; MSG vs SAL,  $p < 0.05$ ) y la exploración subterránea ( $6.5 \pm 0.8$  vs  $9.2 \pm 0.9$ ; MSG vs SAL,  $p < 0.05$ ). Los antagonistas de receptores tipo "Kainico" y

"Metabotrópico" revirtieron algunos de los efectos inhibitorios del MSG. Concluimos que los receptores glutamatérgicos del n úcleo accumbens parecen participar en la expresión de conductas inducidas por la novedad.

**107. Caracterización conductual del laberinto en cruz elevado asimétrico en la rata: efecto de las benzodiacepinas** Alvarez E.O. y Ruarte M.B.,

UNIFCO, Cátedra de Farmacología y Física Biológica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza

El estudio de los mecanismos cerebrales de la motivación y la emocionalidad ha inducido el desarrollo de dispositivos experimentales que permiten cuantificar estos procesos. Nuestro laboratorio ha propuesto un laberinto en cruz, elevado asimétrico como herramienta complementaria para cuantificar estas variables. El objetivo del presente trabajo fue evaluar motivación y emocionalidad en ratas tratadas con benzodiacepinas que se dice influyen en estos procesos. Para ello grupos de ratas adultas se inyectaron i.p. con 1 mg, 2 mg y 3 mg/Kg peso de Diazepam. Agua destilada se consideró control. Los resultados mostraron un aumento significativo de la exploración (índice de motivación) en los brazos ansiogénicos con la dosis 1 mg/Kg pero inhibición de esta conducta a la dosis mayores ( $59.5 \pm 9.3$  vs  $7 \pm 11.2$  cuentas, benzodiacepina vs control,  $p < 0.01$ ). No hubo cambios en los brazos ansiolíticos pero la permanencia (emocionalidad) en uno de estos aumentó significativamente con las dosis ( $184 \pm 28$  vs  $6 \pm 29$  cuentas, benzodiacepina vs control,  $p < 0.01$ ) sin modificación en los otros brazos. En conclusión: los resultados sugieren que las benzodiacepinas tienen efecto bifásico y afectan diferencialmente la motivación y la emocionalidad.

**108. Efectos de la falta de predicción sobre el status social en ratas.** Lorena Rela, A.P. Lemoine, E.T. Segura.

Lab. Fisiología del Comportamiento, IBYME, Fac. Psicología, UBA, Buenos Aires.

El objetivo del presente trabajo es analizar los cambios en la jerarquía social de ratas dominantes sometidas a un protocolo de falta de predicción. Se formaron pares de animales, analizándose la jerarquía social (test de acceso limitado al agua, animales deshidratados). Se asignó luego 7 pares de a uno de los siguientes protocolos (se trató solo a los animales dominantes): estimulación por shocks a intervalos fijos (IF) o variables (IV), manipulando el grado de predicción que cada animal tiene sobre el momento de aparición del estímulo. Posteriormente, se volvió a estudiar el nivel de dominancia de los dominantes. La prioridad de acceso al agua y desplazamiento de la fuente (resumidos en un índice de dominancia,  $2.48 \pm 0.24$  vs  $2.53 \pm 0.18$  IF y  $2.18 \pm 0.17$  vs  $1.66 \pm 0.20$  IV) y diversos indicadores del nivel de agresión (datos no consignados) muestran una disminución del nivel jerárquico de los animales dominantes por efecto del tratamiento IV, sin cambios en el grupo IF. Estos resultados encuadrán dentro de los efectos individuales del estrés por falta de predicción descriptos en trabajos previos.

**109. Perfiles cognitivos diferenciales entre la demencia del lóbulo frontal y la demencia de tipo**

**Alzheimer.** P. Harris (#,\*), RF. Allegri (#,\*), F. Taragano (#), J. Paz (#), C. Mangone (&).

(\*) CONICET, Servicios de Neuropsicología del (#) CEMIC, y del (&) Hospital Santojanni. Buenos Aires.

El deterioro de memoria y de otras funciones cognitivas identifican al inicio de la demencia de tipo Alzheimer (DTA), mientras que los cambios conductuales caracterizan a la demencia del lóbulo frontal (DLF). Sin embargo, en la práctica clínica, el diagnóstico diferencial es frecuentemente difícil. **Objetivos:** describir los perfiles cognitivos diferenciales característicos de los pacientes con DLF y DTA. **Pacientes y métodos:** los pacientes con DTA (NINCDS ADRDA criterio; n=20), DLF (Lund y Manchester criterio; n=12) y los controles (n=20) estaban apareados por edad y escolaridad. Dentro de los exámenes complementarios (TAC - IRM, SPECT y labs) se realizó una extensa batería neuropsicológica dirigida a las áreas de memoria, lenguaje, atención, visuoespacial, abstracción y función ejecutiva. Los puntajes obtenidos fueron normalizados mediante los puntajes Z. **Resultados:** Ambos grupos de pacientes tuvieron resultados significativamente inferiores al de los controles ( $p < 0.05$ ). Los promedios de los puntajes Z de cada función fueron:

	Memoria	F. Ejecutiva	Lenguaje	Atención
DTA	-4.99	-2.10	-2.66	-1.44
DLF	-3.47	-2.19	-0.40	-0.47

Los pacientes con DTA mostraron un deterioro global de la memoria, trastornos del lenguaje, visuoconstrucción y funciones ejecutivas. Los sujetos con DLF, presentaron déficit de memoria, alteración de las funciones ejecutivas con relativo respeto del lenguaje, cálculo y visuoconstrucción. **Conclusiones:** la evaluación neuropsicológica es una herramienta indispensable para diferenciar los estadios precoces de la DTA y la DLF.

**110. El l-deprenyl revierte el aumento de NO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observado en neutrófilos de pacientes parkinsonianos tratados con l-dopa.** EM Gatto, MC Carreras, NA Riobo y JJ Poderoso.

Lab. Metabolismo del Oxígeno, Htal de Clínicas UBA, Buenos Aires.

Numerosas evidencias sugieren que el óxido nítrico (NO) podría ser un mediador de la neurodegeneración de la sustancia nigra en la enfermedad de Parkinson (EP). Recientemente describimos un aumento superior al 57% en la producción de NO durante el estallido respiratorio en neutrófilos (PMN) de pacientes con EP de reciente inicio y crónicamente tratados. El l-deprenyl, un inhibidor de la MAO-B, ha sido empleado con el objeto de retrasar y disminuir las dosis de DA. Observaciones *in vitro* le confieren además una capacidad neuroprotectora. A fin de evaluar el efecto del l-deprenyl sobre el estrés oxidativo en PMN de pacientes con EP, activados con PMA se midió por técnica de O<sub>2</sub>Mb a metMb a 577nm la producción de NO en 10 controles y en 5 pacientes con EP antes y después de la administración crónica de 10mg de l-deprenyl. Del mismo modo y por técnica fluorométrica se midió la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La adición de l-deprenyl disminuyó significativamente la producción de NO en los PMN de pacientes con EP (controles:  $0.56 \pm 0.05$ , EP sin deprenyl:  $0.89 \pm 0.09$ , EP con L-deprenyl:  $0.63 \pm 0.09$   $p < 0.05$ ). El mismo efecto se ob-

servó en la producción de  $H_2O_2$  (control:  $3.15 \pm 0.47$ , EP/s deprenyl:  $4.52 \pm 0.17$ , EPc/deprenyl:  $2.50 \pm 0.17$  p<0.05). *In vitro*, el l-deprendenyl no inhibió la detección electroquímica de NO y O<sub>2</sub>- generado por el sistema xantina/ xantina oxidasa, indicando que su efecto podría ser por inhibición de las enzimas del "burst" o de su expresión. En este sentido, la incubación de PMNs controles con l-deprendenyl no produjo cambios sobre la actividad de síntesis de NO y O<sub>2</sub>- sugiriendo un efecto tardío o mediado por desmetileselegilina.

**111. Efecto de los neuroesteroideos sobre la liberación de <sup>3</sup>H-dopamina de tejido cerebral de ratas hembra** A Mampel; C Bregonzio; R Cabrera.

*Laboratorio de Investigaciones Cerebrales LINCE-CONICET, Mendoza.*

Los neuroesteroideos son compuestos derivados de las hormonas esteroideas sintetizados en el tejido nervioso. En trabajos previos demostramos que Progesterona (Pg) modula la liberación de dopamina inducida por el agonista glutamatérgico NMDA. El objetivo del presente trabajo fue comprobar el efecto de Allopregnenolona (ALL) sobre la liberación de <sup>3</sup>H-Dopamina (<sup>3</sup>H-DA) inducida por NMDA (100  $\mu$ M) de cortes de cuerpo estriado e hipotálamo medio basal, utilizando el método de superfusión. Se utilizaron ratas hembra en diferentes condiciones hormonales. ALL fue agregada en el líquido de superfusión en dosis de 50 a 600 nM. Los resultados se expresaron en función de la DA captada por el tejido en % y analizados estadísticamente utilizando ANOVA 1 seguido de Student-Kewman-Keuls. ALL (50 y 100nM) facilitó la liberación inducida de <sup>3</sup>HDA de cuerpo estriado en ratas en estro (p<0.01 respectivamente) el cual fue anulado por la ovariectomía. La administración exógena de estrógenos (25 $\mu$ g/rata s.c.) y Pg (1 mg/rata s.c.) recuperó el efecto facilitador (p<0.05). Por el contrario, en cortes de hipotálamo mediobasal de

ratas en estro ALL (50nM) inhibió la liberación de 3HDA (p<0.01). El mecanismo de acción modulatoria de ALL sobre los terminales dopaminérgicos sería dependiente del área cerebral involucrada al mismo tiempo que requeriría de la presencia previa de estrógenos y Pg.

**112. Correlación entre las latencias y amplitudes del potencial muscular evocado por el estímulo en diferentes puntos de la corteza motora.** MJ Segura , M Miranda y REP Sica.

*Laboratorio de Fisiología Cortical. Hosp. Ramos Mejía. Buenos Aires.*

Se investigó la correlación entre latencia (L) y amplitud (A) de los potenciales motores (PM) obtenidos por mapeo cortical (MC) en un grupo muscular distal. Se estudiaron 6 voluntarios sanos (16 a 35 años) mediante MC del músculo ADM. Empleando estimulación magnética se excitaron 16 posiciones corticales, separadas por intervalos de 2 cm a ambos lados del plano biaurial, con una intensidad 10 % del umbral motor. El registro se realizó sobre la zona de placa del músculo ADM contralateral durante la contracción voluntaria normalizada, obteniéndose de 3 a 5 respuestas por punto de estímulo. En 6 sujetos no se observó una correlación significativa ( $r=0.25$ ; p=n.s) entre las L y las A de las respuestas motoras evocadas por estímulo sobre diferentes puntos del mapa motor. El análisis individual de estas variables mostró una correlación negativa en 4 casos ( $r=-0.58$ ;  $r=-0.83$ ;  $r=-0.52$ ;  $r=-0.71$ ) y positiva en sólo 2 ( $r=0.56$ ;  $r=0.36$ ). Los resultados sugieren que las diferencias para estas variables entre grupos musculares distales y proximales dependerían de una mayor variabilidad interindividual en la representación cortical de los grupos distales.

**Infecciosas**

- 113. Niveles de anticuerpos neutralizantes (AcNT) en las distintas formas de infección humana por virus Junín (VJ).** Ana Ambrosio; Carmen Saavedra; Laura Riera; María Sottosanti; Marta Sabattini.

INEVH "Dr JI Maiztegui" -Pergamino, Buenos Aires.

Para buscar diferencias en la cinética o magnitud de la respuesta en Ac NT generada por las formas conocidas de infección humana por VJ, en este estudio se compararon la evolución de los niveles de AcNT durante dos años post-infección (pi) y los títulos medios de AcNT en: 1) pacientes con Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA; n= 55); 2) individuos con infección natural subclínica por VJ (n= 62); y 3) vacunados con Candid 1 (n= 54). Cuatro muestras de suero tomadas entre 60 días y 2 años pi fueron estudiadas mediante NT por reducción del 80% de ufp en células Vero bajo agarosa. Las comparaciones de títulos medios entre muestras independientes y no independientes se realizaron mediante sendos test "t", y las conclusiones fueron: \* No se detectaron diferencias significativas entre puntos ( $p>0,05$ ) en las curvas del seguimiento longitudinal en ninguno de los grupos estudiados. \* Los títulos medios de AcNT responden a la virulencia de la cepa infectante y difieren significativamente entre grupos ( $p<0,05$ ) según el esquema siguiente:

Pacientes FHA (Grupo 1)	>	Inf. Subclínica (Grupo 2)	>	Candid 1 (Grupo 3)
X = 771 ± 2,28		X = 229 ± 3,07		X = 49,22 ± 2,41
Rango = 10- 10240		10- 10240		10- 2560

- 114. La respuesta en anticuerpos neutralizantes (AcNT) para virus de la coriomeningitis linfocitaria (VLCM) en infecciones sucesivas por arenavirus.** Ana Ambrosio, Carmen Saavedra, Laura Riera, María Sottosanti, Marta Sabattini.-

INEVH "Dr JI Maiztegui", Pergamino, Buenos Aires.

La coexistencia endémica de dos arenavirus, Junin (VJ) y LCM en la misma región de Argentina, ofrece un modelo único para estudiar infecciones sucesivas por arenavirus patógenos para el hombre. Con el objeto de buscar interacciones en la respuesta inmune a estas infecciones consecutivas se evaluaron los títulos de AcNT anti-LCM y su evolución en el tiempo en los siguientes grupos de individuos: a) el grupo control fueron encuestados positivos para VLCM (infección subclínica; n=59); b) positivos para VLCM inoculados con VJ vacunal (n= 29), y c) positivos para VLCM infectados con VJ silvestre (FHA, n= 65). Se utilizó NT por inhibición del 75% de ufp de VLCM en células L bajo agarosa. Las comparaciones intra y entre muestras se analizaron mediante sendos test "t". Las curvas de evolución de Ac en cada grupo fueron mesetas estabilizadas en los siguientes títulos promedio : a)  $12,39 \pm 1,21$ ; b)  $9,79 \pm 1,15$ ; c)  $16,81 \pm 1,51$ . No se demostraron diferencias significativas entre los títulos medios del grupo control (a) respecto de los grupos con infecciones consecutivas (b,c). Estos resultados demuestran que la respuesta en AcNT a VLCM

no es modificada por una infección agregada por VJ cualquiera sea su virulencia y enfatizan la utilidad de la NT para distinguir serológicamente a las infecciones por arenavirus.

- 115. Localización ultraestructural de P-20, una nueva proteína de Escherichia coli enteroagregativa (EAEC), y su participación en la agregación bacteriana.** N. Sanjuan\*, M. A. Almirón#.

\*Lab. Patología Experimental, Dept. Microbiología, Fac. Medicina, UBA.; #AN.L.J.S. "Dr. Carlos G. Malbrán", Buenos Aires.

Anteriormente describimos el hallazgo de P-20, una proteína de 20 KDa sintetizada sólo en fase estacionaria de crecimiento de EAEC. Su regulación positiva transcripcional durante esa fase fue demostrada por la obtención de un mutante sigma S- en la cepa prototípica de EAEC. En este trabajo se estudió la ubicación ultraestructural de P-20 en las bacterias, y la adherencia a células eucarióticas del mutante, comparado con su contraparte salvaje. Se preparó un suero contra P-20 utilizando como antígeno a la proteína purificada, y se realizó inmunomicroscopía electrónica con oro coloidal y tinción negativa concomitante en las bacterias productoras de P-20, con suero inmune ó preinmune. Los estudios de adherencia a células eucarióticas y de agregación bacteriana se realizaron en monocapas de células Hep-2. Los resultados indican que P-20 se ubica en forma periódica y simétrica en la superficie del soma bacteriano, sin relación aparente con los flagelos ni con los distintos tipos de simbrias conocidas. Con el suero control preinmune no se detectó marcación. Las bacterias mutantes (carentes de P-20), si bien se adhieren a las células eucarióticas igual que las EAEC salvajes, tienen exacerbado el fenotipo de agregación característico de este tipo de Escherichia coli.

- 116. El óxido nítrico en la endotoxemia altera las mitocondrias del diafragma de rata a través de la producción peroxinitrito.** C.L. Lisdero, S. Lanone, M.C. Carreras, M. Aubier, J.J. Poderoso and J. Boczkowski.

Unité 408, Inserm, Hôpital Bichât, París. Lab. Metabolismo del oxígeno, Itat de Clínicas, UBA, Buenos Aires.

La insuficiencia diafragmática es una causa de aumento de la morbilidad y mortalidad en pacientes sépticos aunque las causas no están definidas. En este estudio se analizaron en el diafragma la expresión y la actividad de la óxido nítrico sintasa inducible (NOSi) y el consumo de O<sub>2</sub> y la producción de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (dismutación del anión superóxido) de mitocondrias aisladas que se relacionaron con la función diafragmática (fuerza y contractilidad). Las ratas fueron inyectados i.p. con solución salina (grupo A), con 10 mg/kg. de endotoxina de E.coli (grupo B) o igual dosis de endotoxina más un inhibidor de la NOS (LNMMMA) (grupo C). Los resultados mostraron en el grupo B, una disminución de la fuerza diafragmática, asociado con un aumento

de la expresión y la actividad de la NOSi, un 40% de disminución en el control respiratorio mitocondrial y un 80% de aumento en la producción de  $H_2O_2$ , comparado con el grupo A; estos hallazgos fueron parcialmente revertidos por L-NMMA. Asimismo se detectaron residuos de nitrotyrosina en mitocondrias del grupo B. Estos resultados sugieren que en la endotoxemia, la sobreproducción de NO y el concomitante aumento de la producción de anión superóxido producen peroxinitrato que al nitrar proteínas mitocondriales afecta el metabolismo oxidativo.

**117. Evolución de la Infección por *T. cruzi* modificada por la administración de Gangliósidos. AR Fernández, JE Enders, DH de Bronia, P Paglini.**

Cát. de Física Biomédica, Inst. de Fisiol. y Cát. de Química Biológica, Fac. Cs. Médicas, U.N.Cba, Córdoba.

Trabajos previos demostraron que en ratones con enfermedad de Chagas aguda experimental, los gangliósidos son capaces de modificar la evolución natural de la infección. En el presente trabajo se estudió en qué medida estos cambios observados en la etapa aguda permanecen a los 120 días de finalizado el tratamiento, y así determinar la eficacia del mismo mediante el estudio de los receptores  $\beta$ -cardíacos, electrocardiograma, y serología. Los grupos fueron: normal (N), sin infectar y tratado con gangliósidos (N+G), infectados con  $7 \times 10^4$  triponastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuen/animal (T), e infectado y tratado con gangliósido, 33 mg/Kg/día durante 1 mes (T+G). La parasitemia se negativizó a los 21 días. Los receptores  $\beta$ -cardíacos se marcaron con dihidroalprenolol tritiado. El grupo T+G no presentó modificaciones ni en la afinidad ( $2,79 \pm 0,14$  nM), ni en la densidad ( $74,27 \pm 1,04$  fmol/mg prot) de los receptores  $\beta$ -cardíacos cuando se los comparó al grupo normal ( $3,61 \pm 0,05$  nM y  $71,96 \pm 0,36$  fmol/mg prot). El grupo T+G tiene valores de anticuerpos similares al grupo T, difiriendo del N y N+G. Los registros electrocardiográficos no manifestaron diferencias entre los grupos N, N+G y T+G, expresándose las lesiones típicas de esta tripanosomiasis en el grupo T. Podríamos concluir que este tratamiento modifica la evolución de la infección con normalización electrocardiográfica y del comportamiento de receptores  $\beta$ -cardíacos que sugieren una interacción del gangliósido en los mecanismos involucrados en el desarrollo de la patología cardíaca. Subsidiado por SECyT-UNCba y CONICOR.

**118. Comparación entre PCR e hibridización directa para la detección de virus Junín (VJ). Adriana M. Almará<sup>1</sup>, L.E. Bockstahler<sup>2</sup> and J.L. Sagripanti<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup>Facultad de Cs. Bioq. y Farmacéuticas. U.N.R. y <sup>2</sup>Molecular Biology Branch, Center for Devices and Radiological Health, Food and Drug Administration, Rockville, Maryland, U.S.A.

Se detectó RNA de VJ *in vitro* por hibridización directa y luego de amplificación por PCR, con dos sondas-DNA específicas (recombinante y sintética) y la sensibilidad de ambos métodos fue comparada. Células Vero fueron infectadas con la cepa atenuada XJ-CL3 de VJ y RNA de células y sobrenadantes de cultivo fue extraído después de diferentes tiempos post-infección. RNA de VJ fue detectado por hibridización directa (dot blot) con cada una de las sondas-DNA-<sup>32</sup>P y utilizado para producir cDNA. Un

fragmento de  $151 \pm 24$  bp fue amplificado del cDNA y caracterizado por hibridización con las mismas sondas luego de electroforesis en agarosa y Southern blot. Midiendo la actividad específica de las sondas, la cantidad de radiactividad hibridizada y calculando la amplificación obtenida por PCR, se estimó el número de copias de genoma de VJ en cada muestra. La hibridización directa requirió  $2.0 \times 10^4$  copias de RNA de VJ y 72 horas de exposición a un phosphoimager para una detección confiable. La hibridización con las mismas sondas después de la PCR permitió detectar aproximadamente 20 copias de RNA de VJ después de 2,25 horas de exposición. Estos resultados pueden ser útiles para la selección de técnicas con la sensibilidad adecuada para una rápida detección de VJ.

**119. Unión a mielina de auto-anticuerpos presentes en la infección con *T. cruzi*. Feldman, S\*; García, G\*; Svetaz, MJ\*; Revelli, S\*; Bottasso, O\*; #Avila, JL y Marcipar, AF.**

\*Fac. Cs. Med. y Fac. Cs. Bioq. UNR, F.Fac. Cs. Bioq. UNL# Inst. Biomed. Caracas, Venezuela.

En trabajos anteriores se observó el aumento de auto-anticuerpos IgG anti-sulfocerebrósidos (a-sulf) en sueros provenientes de individuos chagásicos y de ratas con una alta prevalencia en el desarrollo de miocarditis ante la infección con *T. cruzi*. El objetivo de este trabajo fue analizar si fracciones enriquecidas en anticuerpos a-sulf, obtenidas a partir de sueros de ratas chagásicas de la línea "I", poseían capacidad de unirse a la mielina del huésped. Se obtuvieron cortes de cuerpo calloso de cerebro de ratas de  $12\mu$  de espesor ( $n = 20$ ). Los preparados se incubaron con la fracción a-sulf, en diluciones de 1; 0,6 y 0,3 mg/ml, utilizando como control, IgG total de ratas sin infectar. La unión de inmunoglobulinas se reveló mediante técnicas convencionales de inmunofluorescencia. Las observaciones microscópicas, realizadas simultáneamente por dos observadores, mostraron unión de inmunoglobulinas IgG presentes en la fracción enriquecida en a-sulf a la mielina de cuerpo calloso en todas las diluciones consideradas. Esta es una evidencia adicional del mimetismo molecular entre *T. cruzi* y抗原s del sistema nervioso. Como hipótesis el fenómeno descripto podría ser un probable factor desencadenante de la ruptura de mecanismos de autotolerancia.

**120. Tioridazina, posible agente modificador de la evolución de la Enfermedad de Chagas Experimental. HW Rivarola, AR Fernández, S Gea, MS Suligoy, JE Enders, JA Palma, P Paglini.**

Cát. Fís. Biom., Inst. Fisiol., Fac. Cs. Médicas y Cát. Bioq. Clín., Fac. Cs. Químicas, U.N.Cba. Córdoba.

La Tioridazina (Tio) es una droga tricíclica usada en psiquiatría, con acción tripanocida "in vitro". El presente trabajo evalúa la capacidad de Tio para modificar el estadio agudo (35 días post infección) e indeterminado (75 d.p.i) de la enfermedad de Chagas experimental. Se usaron 80 ratones distribuidos en N (sin infectar) y el resto infectados con 50 triponastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuen/animal, agrupados en: A (sin tratamiento), B (tratados con Tio 80 mg/Kg/día vía oral durante 4 días). La efectividad de la droga se valoró analizando, parasitemia, serología, electrocardiografía, receptores  $\beta$ -cardíacos, histopatología y sobrevida. La parasitemia del grupo B fue significativamente me-

nor a los del A, negativizándose a los 25 d.p.i. La serología fue positiva en ambos grupos, pero menor en los tratados. El análisis electrocardiográfico no muestra diferencias entre los grupos infectados. Para estudiar los receptores  $\beta$ -cardíacos se utilizaron fracciones microsómicas de ventrículos con dihidroalprenolol tritiado con y sin propranolol 1 $\mu$ M. La afinidad ( $K_d$  en nM) fue de  $3,61 \pm 0,05$  en N; de  $5,63 \pm 0,26$  y  $6,85 \pm 0,20$  en los ratones sin tratar en los estadios agudo e indeterminado respectivamente. La densidad ( $B_{max}$  en fmol/mg.prot) fue:  $71,96 \pm 0,36$  (N); de  $78,24 \pm 1,67$  y  $77,28 \pm 0,91$  en los dos estadios sin tratar respectivamente. El tratamiento no modificó los parámetros de los ratones infectados salvo la densidad de los receptores en el grupo B, a los 75 d.p.i, que fue similar a los normales. La histopatología del grupo tratado no se diferenció del N. Al cabo de los 75 d.p.i sobreviven el 40% de los animales infectados y el 90% de los tratados. Estos resultados señalan la potencialidad de esta droga tricíclica en la quimioterapia de la Enfermedad de Chagas Experimental. Subsidiado por SECyT-UNCba y CONICOR.

**121. Detección de ARN-HCV por RT-PCR y Carga Viral.**  
Judkowsky V., Baré P., Picchio G., Perez Bianco R.

*IHHEMA, Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires.*

Estudiamos en pacientes hemofílicos HCV (+) la relación entre los resultados obtenidos por el estudio de RT-PCR "home-made" (PCR) y Carga Viral (QV) de HCV, técnicas de detección de ARN viral que actualmente se usan para el monitoreo de la viremia. La técnica de PCR utilizada es la variante "Nested" con primers que corresponden a la región 5' no codificante. El producto de amplificación fue detectado por electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio. La concentración de ARN plasmático de HCV (QV) fue medida mediante HCV-Monitor, Roche. Ambos estudios fueron realizados en paralelo en un total de 125 pacientes. Los resultados fueron totalmente concordantes (PCR+/QV>1000 copias/ml, PCR-/QV<1000 copias/ml) en 109 pacientes. En 11 muestras se encontró que el estudio de PCR resultó (+) mientras que la QV arrojó valores <1000 copias/ml. En los restantes 5 casos no se detectó producto de amplificación por PCR mientras que por estudio de QV se obtuvieron valores >1000 copias/ml. La detección cualitativa de ARN por PCR es generalmente aceptada como el test más sensible, por lo que justificaremos la presencia de viremia en pacientes cuyas cargas virales resultan indetectables. Por otro lado, existen dos explicaciones posibles para la discordancia en los casos con PCR (-) y QV >1000 copias/ml. Una de estas se basa en la probabilidad de error que posee el método de RT-PCR; sin embargo, considerando la población estudiada, podrían existir subtipos de HCV con diferentes secuencias genómicas que no serían detectados por el set de primers de nuestra PCR. El análisis de la secuencia de estos virus será objeto de estudio de futuros trabajos.

**122. Cuantificación de HIV-I ARN en plasma; estudio comparativo entre NASBA y otras técnicas.**  
Zapiola I.\*, Muchnik G.\* Mammana L.\* Aquino B\*, Bartellini MA\*\*, Cassini M\*\*, Quiroz R\*\*, Jauregui Rueda H\*\*, Bellosio W\*\*, Marchetti M\*\*, Monticelli MA\*\*, Fay F\*\*\*, Soto J\*\*\*\*.

\*IDEFI, \*\*Infectología-SPM, \*\*\*BioSidus, Buenos Aires, \*\*\*\*CEDEAC, Mar del Plata.

**Objetivo:** Investigar la variabilidad de la determinación de

carga viral plasmática en pacientes HIV positivos evaluando técnicas con principios metodológicos diferentes. **Métodos:** Se comparó los valores de carga viral plasmática en 30 muestras mediante las técnicas de B-DNA y NASBA y en 10 muestras por las técnicas de AMPLICOR y NASBA. **Resultados:** Nuestros datos muestran una correlación entre los valores obtenidos entre las técnicas de NASBA-B-DNA ( $r=0,93$ ) y NASBA-AMPLICOR ( $r=0,91$ ). La carga viral determinada por NASBA-B-DNA fue detectable por las dos técnicas en 24 pacientes, observándose que en 23, el NASBA mostró valores más altos (media aproximada  $+0,45 \log_{10}$ ). En 4 pacientes resultó no detectable únicamente por B-DNA, mientras que en 2 pacientes resultó no detectable por ambas técnicas. Cuando se determinó la carga viral por NASBA Y AMPLICOR, 8 fueron detectables por ambos métodos con valores levemente más altos por AMPLICOR (media  $0,3 \log_{10}$ ) en 4 pacientes y por NASBA (media  $0,38 \log_{10}$ ) en otros 4; dos muestras fueron no detectables por ambos métodos. **Conclusión:** A pesar que el número de muestras es insuficiente para realizar conclusiones y que existen algunas pequeñas diferencias, los tres ensayos descriptos tienen resultados comparables.

**123. Niveles de carga viral en bovinos infectados con leucosis bovina (BLV).** Dolcini\*, G.L., Gutierrez\*, S.E., Bani\*, P.C., Arroyo\*, G., Rodriguez\*, N.L., D. Ferrer\*\*, J.F. y Esteban\*, E.N.

(\*). *L. de Virología. FCV de la UNCPBA. Tandil.* (\*\*). *Unidad de Retrovirus. Univ. De Pensilvania. USA.*

El BLV comparte características biológicas y moleculares con los virus de la serie HTLV. Por este motivo el sistema bovino/BLV es un modelo valioso de los retrovirus humanos. Objetivos: 1) Establecer criterios para clasificar bovinos BLV+ según su carga viral (CV). 2) Determinar si la CV es estable en el tiempo. 3) Relacionar la CV con el desarrollo de linfosarcoma (LFS). **Métodos:** La CV se determinó con una PCR de ciclado doble con una sensibilidad de 1 copia del provirus por determinación (200 ng DNA). **Resultados:** Once bovinos con <5 a 80 copias del provirus por ug de DNA extraído de leucocitos de sangre periférica (C/ug DNA-LSP) se clasificaron de CV mínima. Siete bovinos con 200 a 1000 C/ug DNA-LSP se clasificaron de CV media. Ocho bovinos con >3500 C/ug DNA-LSP se clasificaron de CV alta. No hubo fluctuaciones significativas de la CV en 6 meses. Cuatro bovinos con CV alta desarrollaron LFS durante el período de observación. **Conclusiones:** Se definieron 3 niveles de carga viral. En este estudio, los bovinos con CV alta mostraron el máximo riesgo de desarrollo de LFS.

**124. Respuesta inmune humoral contra el virus de la Leucosis Bovina (BLV) en bovinos con distintos niveles de carga viral (CV), Linfocitosis (LP) y Linfosarcoma (LFS).** S.E. Gutiérrez\*, G.L. Dolcini\*, P.C. Bani\*, G. Arroyo\*, D. Alejo\*\*, N.L. Rodriguez\*, J.F. Ferrer\*\*. y E.N. Esteban\*, (\*).

*L. de Virología. FCV de la UNCPBA. Tandil.* (\*\*). *Virología. INTA-Balcarce.* (\*\*\*). *Unidad de Retrovirus. Univ. de Pensilvania. USA.*

En el trabajo cuyo resumen se acompaña, clasificamos un grupo de bovinos BLV+ de acuerdo a su CV. Objetivo: determinar en ese grupo, y en bovinos con LP o con LFS la correlación de los títulos de anticuerpos (AC) antivirales, los niveles de CV y la

presencia de LP o LFS. Métodos: los títulos de AC contra la proteína interna p24 y la glicoproteína de envoltura gp51 del BLV fueron determinados mediante ELISAs indirectos, capturando estos antígenos con AC monoclonales. Resultados: los animales con CV mínima tienen títulos de AC anti-p24 y anti-gp51 significativamente menores que los animales con CV media y alta, y especialmente, que los animales con PL o LFS. Estas diferencias fueron más marcadas en el caso de los AC anti-p24. Conclusiones: los títulos de AC contra las proteínas principales del BLV, y especialmente contra la p24, constituyen un indicador adecuado de la CV y, por ende, del riesgo de desarrollo de PL y LFS.

**125. Evaluación de la técnica de carga viral infecciosa. Comparación con la técnica de carga viral plasmática (NASBA).** Inés Zapiola, J\* Waissman, G Muchnik, M.B. Bouzas.

Unidad Virología y \*Sala 19. Hospital F. J. Muñiz, Buenos Aires.

Introducción: Diversos estudios han demostrado que la carga viral infecciosa (CVI) o carga viral por dilución por co-cultivo predice progresión clínica y sobrevida. Objetivo: Evaluar si existe correlación entre la técnica de carga viral infecciosa (CVI) y la técnica de carga viral plasmática (NASBA). Materiales y Métodos: Se estudiaron linfocitos de sangre periférica de 20 pacientes obtenidos a través de un gradiente de Ficoll-Hypaque por CVI y plasma obtenido con EDTA por NASBA-QT. Se ensayaron seis diluciones al quinto (1,1/5,1/25,1/125,1/625,1/3125) por duplicado de cada paciente. Los cultivos fueron mantenidos por 14 días y el sobrenadante de cada dilución ensayado para Ag p24. El resultado es expresado en dosis infectivas en cultivo celular(TCID) / millón de células de paciente. Resultados: Los resultados por ambos métodos fueron analizados por el método de Regresión lineal y correlación. El  $r$  fue de 0,75 ( $p: 0,002$ ). Conclusiones: Valores de CVI >100 TCID se correspondieron con cargas virales plasmáticas altas. El 50% de CVI negativas fueron no detectables por el método de NASBA. El rango de copias/ml para 5 y 25 TCID hallados fue de 500-10000 y 10000-200000 respectivamente. Si bien estos resultados son preliminares se observó correlación entre ambas técnicas.

**126. Hemofiltración precoz en la sepsis con distress respiratorio agudo del adulto. Ensayo clínico con control aleatorio.** O del Río, Pedro, J. C. Ferrería.

Unidad de Cuidados Intensivos. Clínica San Camilo, Buenos Aires. Argentina.

En el síndrome séptico existe una sobreexpresión de mediadores proinflamatorios determinan la disfunción multiorgánica (DMO) y el shock séptico (SS). La hemofiltración (HF) es una estrategia no farmacológica para la remoción de mediadores con actividad inmunomoduladora. La manifestación inicial de la DMO es el distress respiratorio agudo del adulto (DRAA) y se lo tomó como referencia para iniciar la HF (HF precoz). En este estudio se evaluó los efectos de la HF precoz sobre la morbi-mortalidad de la sepsis con DRAA. Se incluyeron 19 pacientes con DRAA secundario a sepsis. Se procedió a realizar estudios diagnósticos y tratamiento de la enfermedad de base así como a las maniobras convencionales para la estabilización hemodinámica y resuscitación tisular. Los que persistían con DRAA a las 36-48 horas fueron asig-

nados en forma aleatoria al grupo control o hemofiltración (HF). Al ingreso en cada grupo se valoró el APACHE II. La lesión pulmonar aguda (ALI) se cuantificó según Murray, JF y col. La severidad de la DMO durante la permanencia en UCI, se evaluó según la puntuación de Le Gall JR y col. Las características técnicas de la HF fueron: veno-venosa (de elección yugular interna con catéter de doble lumen Permacath), con bomba peristáltica de 3 rodillos (Apema NR), intermitente (4 hr/d), de bajo volumen (0.6 L/hr). La reposición de volumen según criterios de estabilidad hemodinámica o de equilibrio hidrosalino. Se utilizaron hemofiltros con membrana de cuprofano (Travenol 2308 NR) con heparinización en la línea aferente. Criterio de suspensión de HF: ALI 0.1-2.5. La morbi-mortalidad se valoró durante la internación en UCI. Los resultados se resumen a continuación:

	Hemofiltración	Control	p
Pacientes,n°	10	9	
Edad,años*	52±15.8(28-71)	68±11.2(43-81)	<0.02*
Sexo,M:F	7:3	6:3	NS**
APACHE II	23±1.0	20±0.90	NS***
DRAA inicial	8/10	6/9	NS**
DMO	8.5±0.90	7.4±1.04	NS***
S.séptico	3/10	6/9	NS**
SS, irreversible	1/10	5/9	<0.05****

\*media±DS. \*Test U de Mann-Whitney. \*\* Test de Fisher para 2 colas. \*\*\* Media ±ES; test de t. para 2 colas \*\*\*\* Test de Fisher para 1 cola. NS: No significativo. Conclusiones. 1) La HF precoz disminuye significativamente la mortalidad de la sepsis con DRAA ( $p<0.05$ ). 2) La disminución de la mortalidad se relacionó con la menor incidencia de shock séptico refractario a drogas 3) Estos resultados confirmarían que los mediadores plasmáticos removidos por la HF son una causa contributoria al SS. 4) La HF no modificó la incidencia de DMO, respecto al grupo control.

**127. Colonización de la mucosa gástrica por Lactobacillus salivarius.** N. Sanjuán\*, M. P. Brizio\*, M. Ytques\*, G. Martos#.

\*Lab. Patología Experimental. Dept. Microbiología, Fac. Medicina UBA; #CERELA, Tucumán.

*Lactobacillus salivarius* (Ls) inhibe el desarrollo de *Helicobacter pylori* *in vitro* e *in vivo*. Los mecanismos de adherencia de Ls a la mucosa gástrica son desconocidos. En este trabajo describimos que Ls es un habitante normal de la mucosa gástrica del ratón, constituyendo un adecuado modelo experimental de colonización. Se emplearon ratones Balb/c SPF endocriados, con alimentación balanceada. Se tipificó a Ls como subespecie salicinus, a partir de cultivos de mucosa gástrica. Se realizaron cortes histológicos seriados coloreados con H-E, Gram y Giemsa, y tratados con inmunoperoxidasa empleando un suero específico contra Ls. Se realizaron cortes ultrafinos de microscopía electrónica de la mucosa gástrica y de cultivos de Ls, y técnicas de tinción negativa ultraestructural. Los resultados indican que Ls tiene una pared celular 3 veces más gruesa que otros *Lactobacillus*, recubierta de estructuras periódicas semejantes a adhesinas. Estas últimas forman una gruesa capa, exterior a la pared celular. Ls coloniza la mucosa gástrica ubicándose predominantemente en la mucina, sin adherencia directa a las microvellosidades de las células. El número de Ls es constante, de aproximadamente  $6 \times 10^4$  unidades formadoras de colonias por gramo de mucosa. La inoculación por vía oral de otros *Lactobacillus* (*L. casei* *casei*) en los ratones colonizados por Ls no resultó en la colonización por *L. casei* de la mucosa gástrica. Es probable que Ls pueda ser utilizado como

agente probiótico contra H. pylori en humanos.

128. **Trastorno respiratorio agudo del adulto. Evaluación anatómo-clínica.** D.Peña, Clarisa Alvarez, G.Semeniuk.

*Inst.Invest. Médicas A.Lanari - U.B.A. Buenos Aires.*

Propósito: Correlacionar clínica, tratamiento, causas de muerte y estadio histológico pulmonar. Métodos: Se revisaron 1177 necropsias, hallándose 29 con daño alveolar difuso(DAD), excluyéndose 8. Resultados: incidencia 2,46%. Edad media 42

años, relación fem/masc.1.63. Causas de muerte: Pulmonar: 52,38%, Extrapulmonar: 19,05%, Mixtas: 28,57%. 9 fallecieron sin sospecha de distrés (42,86%). Lapso entre diagnóstico y muerte: 5,4 días (1 - 21). Tratamiento: Ventilación mecánica: 86%, Hemodiálisis: 29%, Corticoides: 43%, Antibióticos 100%, Hemofiltración 19%. Del total de muertes de causa pulmonar, sólo el 18% recibió corticoides. Estadios de DAD: 43% fase exudativa, 24% exudativa-proliferativa, proliferativa 24% y proliferativa con fibrosis 9%. Conclusiones: Mayoría de muertes de causa pulmonar. Lapso entre diagnóstico y muerte corto. Gran porcentaje no diagnosticado. Los esteroides parecen proteger el pulmón.

**Inmunología e Inmunofarmacología**

- 129. Interrelación entre subpoblaciones de células T de mucosa bronquial e intestinal en ratas Wistar inmunodeficientes.** María Gabriela Márquez, María Estela Roux.

*Laboratorio de Inmunología Celular, Depto de Ciencias Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Buenos Aires*

Estudios previos en ratas inmunodeficientes por déficit proteico severo al destete que a continuación se les administró por vía oral caseína al 20% durante 21 días (R21) demostraron disminución en el número de células B IgA, T CD5, CD4 y CD8 en la lámina propia (LP) del tejido linfoideo asociado a bronquios (BALT). Objetivos: 1) investigar si en R21 existen alteraciones en las subpoblaciones T CD8 $\beta$ , CD8 $\alpha$ , CD25 y TCR $\alpha/\beta$  en LP e intraepitelio (IE) del BALT y 2) relacionarlas con las halladas previamente en vellosidad intestinal (Vi). Resultados: número de células en 15 campos en cortes de bronquios por inmunohistoquímica ( $\bar{X} \pm ES$ , en R21 vs C): a) en LP: CD8 $\alpha$ :  $140.0 \pm 10.5$  vs  $259.4 \pm 14.0$ ; CD25:  $136.4 \pm 17.9$  vs  $21.8 \pm 10.1$ ; TCR $\alpha/\beta$ :  $127.4 \pm 10.3$  vs  $164.8 \pm 11.4$ ,  $p < 0.05$  y CD8 $\beta$  pNS; b) en IE: solo disminución de la subpoblación CD8 $\alpha$   $14.3 \pm 3.2 \pm 4.3$ ,  $p < 0.05$ . Estos resultados difieren de los hallados en Vi donde solo se observó disminución de células CD4 y aumento de CD8 $\alpha$  y CD25 en IE. Conclusión: se confirma una subcompartimentalización en mucosas que influye la migración de células activadas en Vi -por administración oral de caseína- que vuelven preferentemente al sitio inductor, a pesar que intestino y BALT forman parte del sistema inmune común de mucosas. (Financiado por FA 057).

- 130. Actividad Natural Killer e interleuquina-6 circulante en Enfermedad de Cushing (E).** Estela Cardoso, Victoria Goldberg, M. Vitale, A. Chervin, Enia Comini, Liliana Contreras.

*Departamento de Endocrinología, Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari, Facultad de Medicina, Buenos Aires.*

La actividad Natural Killer (NK) y la interleuquina-6 (IL-6) son mediadores de la respuesta inmune innata. En este estudio investigamos la citotoxicidad (NK basal y estimulada) y los niveles circulantes de IL-6 en Síndrome de Cushing ACTH dependiente (E) e independiente (iatrogénico, I). Se estudiaron 3 pacientes con E y 4 con I. El grupo control (C) consistió en 6 donantes sanos. Los sujetos no cursaban infecciones y estaban eutérmicos. En todos los casos se obtuvo una muestra de sangre (8-9 hs) para determinación de IL-6, ACTH, cortisol, índice neutrófilo/linfocito y ensayo de actividad NK basal y estimulada con interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) proteína A de *S. aureus* (SPA) e interleuquina-2 (LAK). Se obtuvieron las siguientes citotoxicidades (media (DS) / UL / 10<sup>6</sup> LP) NK basal: E:  $166 \pm 51$ ; I:  $88 \pm 29$ ; C:  $212 \pm 75$  (E vs I:  $p < 0.05$ ); NK-IFN: E:  $332 \pm 175$ ; I:  $175 \pm 86$ ; C:  $772 \pm 236$  (E e I vs C:  $p < 0.05$ ); NK-SPA: E:  $139 \pm 72$ ; I:  $125 \pm 56$ ; C:  $566 \pm 207$  (E e I vs C:  $p < 0.05$ ). LAK-E:  $492 \pm 171$ ; I:  $276 \pm 68$ ; C:  $784 \pm 183$  (E e I vs C:  $p < 0.05$ ). Los valores de IL-6 (pg/ml): E:  $24 \pm 22$ ; I:  $8.4 \pm 7.7$ ; C:  $10 \pm 7$  (NS). No fueron diferentes los índices N/L entre grupos. De los resultados se infiere: 1) El posible rol de la ACTH y/o derivados

de la POMC en preservar la actividad basal de las células NK a pesar del elevado nivel circulante de cortisol en E. 2) Ausencia de inhibición de los niveles circulantes de IL-6 en hipercorticismo endógeno (ACTH dependiente) y exógeno.

- 131. La IL-1 $\beta$  es inducida durante la potenciación neuronal a largo plazo (LTP) y es necesaria para su mantenimiento in vitro e in vivo.** H. Schneider<sup>1</sup>, F. Pitossi<sup>2</sup>, D. Balschun<sup>3</sup>, A. del Rey<sup>4</sup> y H. O. Besedovsky<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>*Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Buenos Aires, Argentina*, <sup>2</sup>*Institut fuer Physiologie, Marburgo, Alemania*, <sup>3</sup>*Neurobiologisches Institut, Magdeburg, Alemania*.

La interleuquina-1 $\beta$  (IL-1), junto a otras citoquinas, juega un rol destacado en procesos inmunológicos en el cerebro en enfermedades como Alzheimer, encefalitis por infecciones por HIV, etc. Esta citoquina también es producida en el cerebro sano y se ha postulado una probable vinculación a procesos propios del SNC. Sin embargo, no existe evidencia fehaciente sobre ello. En el presente trabajo se demuestra que la transcripción del gen de la IL-1 se ve aumentada durante la potenciación a largo plazo (LTP), un proceso exclusivamente neural que se supone se halla vinculado con mecanismos relacionados con la memoria y el aprendizaje. Asimismo, se observó que el bloqueo de los receptores para IL-1 resulta en la inhibición del mantenimiento de la LTP. Estos resultados sugieren que la producción de IL-1 en el cerebro puede ser inducida por la activación de poblaciones neuronales definidas y que esto tiene consecuencias fisiológicas.

- 132. Interacción de anticuerpos de pacientes con síndrome de Sjögren primario y receptores muscarínicos M<sub>1</sub> de glándulas salivales.** Claudia Pérez Leirós, L. Sterin-Borda, R. Arana y E. Borda.

*Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología (UBA), CEFYBO (CONICET) y CEMIC, Buenos Aires.*

El síndrome de Sjögren (SS) es una exocrinopatía autoinmune crónica que se presenta como desorden primario (pSS) o asociado a otras enfermedades reumáticas. Se caracteriza histológicamente por infiltración linfocitaria de las glándulas salivales y clínicamente por signos de sequedad de mucosas oral y ocular. Previamente informamos que anticuerpos (Ac) de pacientes con pSS activan receptores muscarínicos de glándulas exócrinas. El objetivo de este trabajo fue investigar la participación de receptores de subtipo M<sub>1</sub> de glándulas submaxilares de rata en el efecto de los Ac de pSS. Mediante ensayos de ELISA comprobamos que los Ac reconocen al péptido M<sub>1</sub> (pM<sub>1</sub>) de secuencia homóloga a un dominio extracelular del receptor M<sub>1</sub> humano (DO 405 nm, X ± DS, IgG 10<sup>-6</sup> M, normal: 155 ± 16 n=10 pSS: 1112 ± 68 n=5). Además los Ac estimularon la actividad de PKC (pmol/mg/min, X ± ES, IgG 10<sup>-6</sup> M, normal: citosol 22.3 ± 2.1; membrana 29.9 ± 1.9; pSS: citosol 13.1 ± 2.0 membrana 42.8 ± 1.8 n=4), de óxido nítrico sintasa y los niveles de GMPc. Los efectos fueron inhibidos por atropina,

por el antagonista M<sub>1</sub> pirenzepina y por el pM<sub>1</sub>. Los resultados indican que los Ac de pSS reconocen un dominio del receptor M<sub>1</sub> involucrado en la activación de señales intracelulares acopladas a dichos receptores en las glándulas salivales.

**133. Anticuerpos contra receptores M3 muscarínicos de acetilcolina en pacientes con Síndrome de Sjögren Primario (SSP).** Sandra R. Bacman, Claudia Pérez-Leirós, A. Berra, Leonor Sterin-Borda, O. Hübsscher, R. Arana y E. Borda.

Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología y Cátedra de Patología, Fac. de Medicina, UBA, y CEFYBO-CONICET, Buenos Aires

**Introducción:** Uno de los signos característicos del SSP es la presencia de ojo seco. Las glándulas lagrimales producen el componente acuoso de la secreción lagrimal, regulado por el sistema parasimpático. **Objetivos:** Estudiar la interacción entre los anticuerpos (Ac) presentes en el suero de pacientes con SSP (IgG-SSP) y la glándula lagrimal extraorbital (GLE), como órgano blanco de esta patología. **Métodos:** Estudios de IFI, de unión específica y valoración de inositoles fosfato (IP) en GLE de ratas Wistar adultas y hembras. **Resultados:** a)IFI: la IgG-SSP dieron fluorescencia positiva en los tejidos tubulares de la GLE (dil 1/1000), con respecto al control de IgGn. b)Ensayos de unión específica y análisis de Scatchard: la IgG-SSP (10<sup>-6</sup>M) disminuyó el número máximo de sitios (Bmax: fmol/mg prot): 155,1±8,0, sin cambios en la constante de disociación Kd (nM): 0,102±0,010, respecto a la IgGn (Bmax: 226,3±10,1 y Kd: 0,098±0,009. c)Producción de IP: la IgG-SSP induce su estimulación: 105±15 unidad área (U/A)/mg tej. húm., mientras que la IgGn no modificó los valores basales: 23±4 UA/mg tej. húm. Se compararon estos resultados con la estimulación con carbacol y fueron bloqueados con atropina, 4-DAMP y neomicina. **Conclusiones:** Existiría en el suero de pacientes con SSP otro factor sérico capaz de unirse a las GLE y activar los receptores M<sub>1</sub>, colinérgicos, para la inducción de señales intracelulares propias de la activación colinérgica muscarínica. Se requieren de otros estudios para valorar la posible participación de estos anticuerpos en la patogenia de esta enfermedad.

**134. Cambios diurnos en el efecto inmunosupresor de la ciclosporina en ganglios linfáticos submaxilares de ratas.** D.P. Cardinali, Laura Selgas, Patricia Castrillón, Ana I. Esquivino.

Dep. Fisiología, Facultad de Medicina, UBA y Dep. Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid.

A fin de estudiar cronofarmacológicamente la actividad inmunosupresora de la ciclosporina en ganglios linfáticos submaxilares de ratas se utilizó como indicador de proliferación celular la actividad ornitina decarboxilasa (ODC) y como marcadores presinápticos la captación neuronal de <sup>3</sup>H-norepinefrina (NE) y la síntesis de acetilcolina (por la conversión de <sup>3</sup>H-colina en <sup>3</sup>H-acetilcolina). La administración de ciclosporina (5 o 20 mg/kg) produjo una disminución significativa ( $p<0.01$ ), dosis-dependiente, de ODC (pmol/mg prot/30 min) al ser administrada durante la fase diurna del ciclo luz-oscuridad mientras que por la noche sólo la dosis de 20 mg/kg fue efectiva (p.ej., ODC a las 1700 h: 246±19, 112±13 y 66±6, ODC a las 0100 h: 84±5, 82±8 y 39±4, para vehí-

culo 5 y 20 mg/kg, respectivamente). La ciclosporina aumentó la captación de <sup>3</sup>H-NE (fmol/mg/15 min) en forma dosis-dependiente, siendo 5 mg/kg efectiva sólo al inyectarse a las 1300 o 1700 h (p.ej., 1700 h: 4.2±1.2 y 10.6±0.9,  $p<0.01$ ); 0100h: 13.6±1.5 y 12.1±1.7 para vehículo y 5 mg/kg respectivamente). Ambas dosis de ciclosporina aumentaron la síntesis de <sup>3</sup>H-acetilcolina ( $p<0.01$ ). Tanto en ratas inmunizadas como no inmunizadas la inyección de ciclosporina suprimió el ritmo diario de actividad adrenérgica y colinérgica en ganglios submaxilares. Estos resultados indican que la actividad inmunosupresora de la ciclosporina es máxima en la fase de reposo del ritmo diario en la rata.

**135. Anticuerpos antiespermáticos en el fluido folicular humano: incidencia y capacidad inductora de la reacción acrosomal.** C.I. Marín-Briggieler, P.V. Miranda, F. González-Echeverría, M.H. Vazquez-Levin, J.A. Blaquier y J.G. Tezón.

Instituto de Biología y Medicina Experimental, FERTILAB, Buenos Aires.

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que el fluido folicular humano (hFF) contiene anticuerpos inductores de la reacción acrosomal (RA) en espermatozoides humanos. El primer objetivo de este trabajo fue estudiar la incidencia de anticuerpos antiespermáticos en el hFF. Se analizaron los hFF de 40 pacientes participantes de un programa de fertilización asistida. Utilizando el ensayo de "inmunobeads", se detectaron niveles significativos de anticuerpos en 3 (8%) de los mismos. El segundo objetivo fue estudiar la capacidad inductora de la RA de las IgG aisladas de cada hFF (hFFIgG). Las hFFIgG se obtuvieron por cromatografía en proteína A-Sepharosa y se incubaron (10 µg/ml) con espermatozoides capacitados de donantes ( $n>3$ ). Se determinó la RA por tinción con la lectina *Pisum sativum*-FITC. Los resultados se expresaron como porcentaje de estimulación de la RA (%E = %RA hFFIgG - %RA espontánea / %RA hFF - %RA espontánea). Se estableció un valor de corte de %E=8, con el que se clasificó a los hFF de acuerdo a su frecuencia inductora (FI = inducciones positivas/totales) sobre los espermatozoides de diferentes donantes. Se encontró que 5% de las hFFIgG mostraron una FI de 0-0,25; 30% de 0,26-0,50; 30% de 0,51-0,75; y 35% de 0,76-1. Las medianas de %E para los cuatro grupos fueron 3, 7, 16 y 22, respectivamente ( $P<0,05$ ). Este estudio ha permitido la identificación de hFF con anticuerpos, no detectados por el ensayo clásico de "inmunobeads", con capacidad de inducir la RA. Estos anticuerpos podrían utilizarse para identificar抗ígenos del espermatozoide involucrados en la fertilización.

**136. El aumento de la expresión del ARNm del receptor de angiotensina II por lipopolisacárido juega un rol modulador en la liberación de TNF-α.** Silvina Raiden<sup>1,2</sup>, Mónica Costas<sup>2</sup>, E. Arzi<sup>2</sup>, J.R. Geffner<sup>3</sup>, Clarisa Alvarez<sup>1</sup>, Yanina Pereyra<sup>1</sup>, V.E. Nahmod<sup>1</sup>.

Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari, Fac. de Med., UBA<sup>1</sup>, Lab. Fisiología y Biología Molecular, FCEN, UBA<sup>2</sup> y IIHEMA, Academia Nacional de Medicina<sup>3</sup>, Buenos Aires.

Demostramos previamente que el lipopolisacárido (LPS) induce la producción de angiotensina II (AII) por células mononucleares periféricas humanas (CMPH) y que la AII administrada *in vitro*, induce la producción de TNF-α en menor escala que el losartán, bloquante

selectivo del receptor de AII de tipo AT1, inhibe la producción de TNF- $\alpha$  por CMPh estimuladas por LPS. Para explicar la inhibición por losartán en la producción de TNF- $\alpha$  inducida por LPS, estudiamos la expresión del receptor para AII en macrófagos obtenidos a partir de bazo de rata. Ellos fueron cultivados durante 1 hora en condiciones basales o en presencia de LPS (1 $\mu$ g/ml), purificándose luego el ARN y analizándose la expresión del ARNm por Northern blot con una sonda específica. Se encontró que en condiciones constitutivas el ARNm para el receptor de AII es prácticamente indetectable, mientras que bajo estímulo del LPS se expresa claramente una banda específica de 2.3 Kb. Este hallazgo sugiere que, en los macrófagos activados, la liberación de TNF- $\alpha$  podría verse potenciada, merced al incremento en la expresión del receptor AT1. Analizamos, por ello, el efecto antiinflamatorio del losartán *in vivo* en un modelo de inflamación provocado por la administración sistémica de LPS (5 mg/Kg) a ratas pretratadas con losartán (0.1 mg/kg/min) por infusión endovenosa continua durante 4 horas. Al cabo de este tiempo los animales fueron sacrificados y se efectuó la anatomía patológica del pulmón encontrándose una notoria supresión en la respuesta inflamatoria tisular.

**137. Anticuerpos anti-Fibronectina (a-Fn) en pacientes lúpicos.** M. José Svetaz, J. Rossi, M. del Carmen Hourquescos, Maricla Bearzotti, F. Pelusa, Daniela Sorribas y R. Riccomi.

Laboratorio Central. Dpto Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR, Rosario.

Existe disparidad en los porcentajes de positividad reportados para a-Fn en LES y AR. Estudiamos la incidencia de a-Fn en una población de pacientes lúpicos (50) en relación con otros parámetros de laboratorio que se emplean para el diagnóstico y seguimiento de esta enfermedad: título de FAN y a-DNA nativo por Inmunofluorescencia indirecta, VES, actividad de Complemento por técnica hemolítica (CH50) y anticuerpos dirigidos a antígenos nucleares extraíbles (a-ENA) por contrainmunoelctroforesis. Los anticuerpos a-Fn se determinaron por ELISA fijando Fn plasmática humana en tiras de poliestireno y revelando con a-IgG-peroxidasa, sustrato TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El 43% de las muestras analizadas dieron resultados positivos (superiores a 58 U/ml+64 que es la media+2DS de una población normal (40). Se encontró correlación con FAN(rs=0.30, p=0.033), y CH50 (rs=0.32, p=0.035), no así con título de a-DNA y VES. Las muestras a-ENA positivas (mediana=253, rango 92-330) resultaron distintas de las negativas (mediana = 49, rango 26-118) p=0.042. También se observó una mayor frecuencia de valores aumentados entre los pacientes con enfermedad activa y/o que presentaban vasculitis, artritis o dolor muscular. La frecuencia, correlación con otros parámetros de laboratorio y manifestaciones clínicas de actividad de la enfermedad, sugieren la importancia de la determinación de a-Fn en el seguimiento de pacientes lúpicos.

**138. Investigación de la prevalencia de anticuerpos anti-Fibronectina plasmática humana (a-Fnph) en vasculitis y Artritis reumatoidea.** J. Moreno, Alicia Toffi, Nidia Abraham y Ester Saball.

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR, Rosario.

Los datos obtenidos en nuestros laboratorios respecto a una mayor frecuencia de anticuerpos a-Fnph en pacientes lúpicos con

artritis, dolor muscular y/o vasculitis, nos llevaron a estudiar la prevalencia de estos anticuerpos en un grupo de 24 pacientes con diagnóstico de AR con períodos de evolución entre 1 y 20 años y otro grupo de 13 pacientes con vasculitis (VS) a los cuales se les determinó además patrón y título de ANCA por Inmunofluorescencia indirecta en doble sustrato, alcohol y formol. La determinación de a-Fnph se realizó por ELISA inmovilizando en policubetas de poliestireno Fnph purificada en el laboratorio por cromatografía de afinidad con gelatina-Sepharosa. Para ambos grupos se consideraron positivas todas aquellas muestras cuyos valores fueran superiores a 141 U/ml (media +2DS de una población normal, n=28). Para AR 8/24 muestras fueron positivas (33.3%) y la concentración de a-Fnph (mediana=106, rango 81-221) fue significativamente mayor ( $p<0.00001$ ) que los controles. El porcentaje de positividad en VS fue 9/13 (69.2%) y se correlacionó con ANCA (rs=0.59, p=0.041). Los patrones C (2 Wegener) fueron negativos para a-Fnph, resultando positivos los patrones P o P y C, excepto el Churg-Strauss y la vasculitis renal. Estos datos preliminares reafirman el importante papel de la Fn en los procesos inflamatorios y podrían ser una evidencia más del fenómeno de dispersión intermolecular de los autoanticuerpos.

**139. Inmunidad celular y humoral en vitíligo.** M. Bearzotti, F. Pelusa.

Inmunidad Celular, Laboratorio Central, Dpto. Bioq. Clínica, Fac. Cs. Bioq. y Farm., UNR, Rosario.

La patogénesis del vitíligo es aún desconocida, aunque se postulan tres hipótesis. Una de ellas, la teoría autoinmune, involucra una destrucción inmune de los melanocitos y se refuerza por una elevada incidencia de desórdenes autoinmunes asociados y presencia de autoanticuerpos órgano específicos. Nuestro objetivo es establecer si existen anomalías inmunológicas celulares y/o humorales involucradas en la patogénesis. Se estudiaron 23 pacientes con diagnóstico clínico de vitíligo en actividad y que no recibían tratamiento. Se analizaron linfocitos T CD4+ y CD8+ mediante inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales y linfocitos T activados mediante la formación de rosetas con glóbulos rojos de carnero a 37°C (RE37°C). Se estudió la presencia de anticuerpos anti nucleares (ANA), anti microsomas tiroideos (AMA) y anti tiroglobulina (ATA) por inmunofluorescencia indirecta. Todos los pacientes fueron ANA negativo y 5 (22%) fueron AMA y ATA positivos. Respecto a los valores normales para nuestro laboratorio, 9 (39%) presentaron valores de CD4+ aumentados y 3 (13%) disminuidos; 4 (17%) valores de CD8+ aumentados y 5 (22%) disminuidos; y 17 (74%) presentaron valores aumentados de RE37°C. Las anomalías halladas en la población de linfocitos T, especialmente la elevada proporción de linfocitos T activados y la detección de anticuerpos órgano específicos (AMA y ATA) aportan evidencias adicionales que reforzarían la etiología inmune de esta patología.

**140. Actividad neutralizante frente a la toxina tetánica en sueros de conejos inmunizados con las vacunas DPT clásica y acelular.** J. Dokmetjian, V. Lavigne, C. DellaValle, M. Manghi.

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (CONICET/UBA), Buenos Aires.

Para prevenir la difteria, coqueluche y proteger contra el tetanos, recientemente se ha incorporado al arsenal médico la

vacuna triple acelular (DPTa). Estudiamos la inmunogenicidad y la calidad de los anticuerpos formados por el toxoide tetánico (T) como componente de la vacuna DPT clásica y la DPTa. El estudio se efectuó con lotes de 5 conejos inmunizados según el plan oficial. Los niveles máximos de IgG anti-T medidos por ELISA siempre fueron mayores para DPT ( $p < 0.0001$ ). Teniendo en cuenta que ya hemos demostrado que, los Acs. IgG anti-T simétricos purificados tienen una actividad neutralizante de la toxina tetánica aproximadamente 7 veces mayor que los asimétricos, se determinó la relación de ambas poblaciones en los diferentes picos de Acs. empleando Sepharose-Con A. La relación de simétricos/asimétricos aumentó con el tiempo de inmunización llegando a  $41.26 \pm 1.44$  para DPT, y  $22.36 \pm 1.63$  para DPTa. Cuando se midió la actividad neutralizante en sueros con diferentes relaciones de simétricos/asimétricos se observó, en aquellos con títulos próximos al nivel mínimo protector, que la vacuna DPTa es 2 veces más efectiva en la inducción de la actividad neutralizante. Estos resultados indican que la menor proporción de IgG asimétrica originada por DPTa asegura protección cuando los niveles de Acs. anti-T totales son bajos.

- 141. Anticuerpos antidiftéricos en conejos vacunados con DPT tradicional y DPT acelular. Actividad neutralizante en relación a su estructura. C. Della Valle, V. Lavigne, J. Dokmetjian, Marcela Manghi.**

IDEHU. (CONICET/UBA), Buenos Aires.

La vacuna DPT acelular, compuesta por los toxoides tetánico y diftérico y componentes solubles de *B. pertussis*, incorporada recientemente al plan de vacunación, sigue estando sometida a estudios de campo para determinar su óptima formulación. Nos interesó estudiar la capacidad inmunogénica y la calidad de los anticuerpos formados por el componente diftérico de la DPTa y la DPT tradicional. El estudio se efectuó con lotes de 5 conejos inmunizados con vacunas que fueron formuladas con igual cantidad de toxoides, y siguiendo el plan de vacunación vigente. Semanalmente, se valoró por ELISA el nivel de anticuerpos IgG anti-D. Los niveles máximos de Acs. siempre fueron mayores para DPTa ( $p < 0.002$ ). Después del tercer estímulo los títulos fueron  $8.25 \pm 0.15$  UI/ml (DPTa) y  $1.99 \pm 0.09$  UI/ml (DPT). Los Acs. simétricos y asimétricos fueron purificados por Sepharosa-Concanavalina A. La capacidad de ambas poblaciones de Acs. para neutralizar la toxina diftérica medida en DE50, fue 0.108 UI/mg (asimétricos) y 0.422 UI/mg (simétricos). Los resultados indican que el toxoide diftérico en la DPTa es aprox. 2 veces más inmunogénico que en la DPT. También se demuestra que los Acs. asimétricos anti-D tienen menor capacidad de protección para el huésped. Actualmente se está analizando la relación de Acs. simétricos/asimétricos en los sueros de los animales inmunizados con ambas vacunas.

- 142. Variaciones en la presencia de autoanticuerpos detectados por Western Blot (WB) y su utilidad para valorar la actividad de colagenopatías. Amaicha Depino, S.A. Grimaudo, M.E. Lértula, J.A. Manni.**

Inmunología. Instituto de Investigaciones Médicas "Alfredo Lanari". UBA, Buenos Aires.

En un grupo de 953 estudios de WB, se identificaron 82 pa-

cientes a los cuales se les había efectuado una segunda determinación entre 2 y 42 meses después de la primera. Se evaluó una posible relación entre el estado clínico-serológico y las variaciones en la presencia de algunos autoanticuerpos. De los 23 pacientes con anti-Sm (22 Lupus Eritematoso Sistémico -LES-), en 11 la banda permaneció positiva, de los cuales 10 ( $p < 0.01$ ) presentaron algún signo de actividad clínica y/o serológica en ambas oportunidades. La banda se negativizó en 7, mejorando clínica y/o serológicamente 6 ( $p < 0.01$ ) de ellos. De 15 pacientes con anti-RNP (11 LES, 2 S<sup>+</sup> Superposición -SS-, 2 sin diagnóstico), permanecieron positivos 6, de los cuales 5 ( $p < 0.05$ ) mostraron actividad en ambas ocasiones. Entre los 6 pacientes donde se negativizó, 3 (NS) presentaron mejoría. Anti-Pribosomal se detectó en 15 pacientes (14 LES, 1 SS). Se mantuvo positivo en 5, y 4 (NS) de ellos permanecieron en actividad. En 8 pacientes se negativizó, mejorando 6 ( $p < 0.01$ ). Los datos de los pacientes en los cuales las bandas se positivaron presentaron gran dispersión. Estos resultados sugieren que la variabilidad de algunos anticuerpos identificados por WB podría ser útil para detectar cambios en la actividad de determinadas colagenopatías.

- 143. Efectos Colinérgicos de IFN $\gamma$ : Regulación de las Señales de Transducción por Proteína Quinasa C (PKC). María E. Sales, L. Sterin-Borda, M.M.E de Bracco, E.S. Borda.**

CEFYBO-CONICET,Cátedra de Farmacología FOUBA, IIHema Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires.

Hemos demostrado que el IFN $\gamma$  interactúa con receptores (R) colinérgicos muscarínicos (CM) del fleon aislado de rata incrementando la motilidad, inhibiendo la unión específica del [<sup>3</sup>H]-QNB, disminuyendo los niveles de AMPc e incrementando los de GMPc; efectos bloqueados por atropina (AT) $10^{-5}$ M. En el presente trabajo observamos: un incremento en la actividad de fosfolipasa (PL) C con aumento en la producción basal (B) de inositoles fosfato (IPs)(UArea/mg tej. hum.)(B: $62.8 \pm 5.4$ ;IFN $\gamma$  10 U: $125.3 \pm 10.8$ (n=6) bloqueado por AT, NCDC ( $5 \times 10^{-6}$ M), genisteina (G) (30 $\mu$ g/ml) y T Pertussis (TP)(0.5 $\mu$ g/ml); que el incremento en los niveles de GMPc (pmol/mg tej.hum.)(B: $146.4 \pm 5.5$ ;IFN $\gamma$ : $254.9 \pm 7.8$ (n=5) era inhibido por G, stauroporina (ST)( $2 \times 10^{-6}$ M) y L-NMMA( $10^{-4}$ M) lo que implicaba la participación de NO sintasa (NOS). La actividad de NOS medida en pmol/g tej.hum. fue: B: $248 \pm 11$ ;IFN $\gamma$ : $780 \pm 41$  (n=5). El efecto se inhibió con AT, G y ST, lo que indicaba activación de PKC observándose aumento de actividad enzimática en la fracción de membrana (pmol/min.mg prot)(B: $5.4 \pm 0.5$ ;IFN $\gamma$ : $16.5 \pm 0.9$ )(n=4). También medimos la liberación de PGE<sub>2</sub> (pg/g tej. hum) (B: $7.6 \pm 7$ ;IFN $\gamma$ : $198 \pm 10$ ) (n=5) bloqueable por AT, ST y L-NMMA. Concluimos que el IFN $\gamma$  activaría sus propios R y RCM incrementando la formación, por PLC, de IPs y DAG los que sumados al Ca<sup>++</sup> ic activarían PKC quien modularía la actividad de NOS y PLA<sub>2</sub>.

- 144. Lineas linfocitarias B obtenidas por cultivo de células mononucleares periféricas (CMP) de pacientes HIV+. Beatriz Ruibal-Ares, M. Scolnik, Fernanda Palacios, Graciela Méndez, G. Sternik, María M. E. de Bracco.**

IIHema Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires.

Mediante una técnica para el cultivo prolongado de CMP

(Ruibal-Ares et al, Clin Immunol Immunopathol, 82:102, 1997) se montaron cultivos de CMP de 10 pacientes con hemofilia HIV+ y 12 controles normales. Las CMP cultivadas se tiñeron con bromuro de etidio y naranja de acridina y se observaron por microscopía a partir del día 5 y cada 3 días al realizar los cambios de medio de cultivo (RPMI 1640, 10% suero fetal bovino). En 8/10 pacientes HIV+ (en distintos estadios clínicos) se observó que luego de 25-40 días el cultivo era invadido por acumulos de células blásticas semejantes morfológicamente a las halladas en linfomas no Hodgkin (LNH) anaplásicos. En 2 de los controles se detectaron células iguales, pero el desarrollo sólo se observó luego de 40 días. Las líneas derivadas de los pacientes y de los 2 controles se mantuvieron en cultivo continuo sin estímulos. Las células, caracterizadas por citometría de flujo, expresaban antígenos pan-B, CD38+, HLA-DR+, bcl-2+, eran CD5- y monoclonales por restricción de cadenas livianas κ y λ. La clonalidad se confirmó por PCR. Pese a que ninguno de los pacientes tenía LNH, será necesario evaluar si este hallazgo *in vitro* se relaciona con el ulterior desarrollo de LNH asociado a SIDA.

- 145. Mecanismos de amplificación de virus MMTV. I. Capacidad superantigénica.** Valeria Buggiano, P. Bekinschtein, Irene Nepomnaschy, Alejandra Goldman, Gabriela Lombardi, Adriana Deroche, Isabel Piazzon.

*IHHEMA, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.*

Habíamos descripto la aparición de virus recombinantes (LA) entre un MMTV exógeno y el provirus Mtv-7. Estos virus - que expresan el superantígeno (Sag) del Mtv-7- se encontraban en muy bajo título en los huéspedes F1(BALB/cxAKR) en los que se originaban, pero la carga viral aumentaba rápidamente en huéspedes Mtv-7 negativos. Investigamos los mecanismos involucrados en la amplificación viral inoculando leche a) portadora de LA o b) libre de MMTV, en la almohadilla plantar de huéspedes BALB/c. Se determinó -utilizando métodos citofluorométricos y anticuerpos monoclonales- el porcentaje y número absoluto de linfocitos: 1)CD4+ VB6+ (reactivos al SAy de LA), 2)CD4+VB10+ (no reactivos al SAy) y 3) IgG+, en el ganglio popliteo drenante entre los días 2 y 7 posteriores al inóculo viral. Al día 4 -pico de la respuesta- los resultados (expresados como número absoluto ( $x10^{-5}$ ) $\pm$ DS (n)) fueron: 1: a)  $32\pm3(6)$  vs b)  $1.5\pm0.2(4)$ ; 2: a)  $0.5\pm0.04(4)$  vs b)  $0.39\pm0.03(4)$ ; 3: a)  $45\pm3(4)$  vs b)  $3\pm0.2(4)$ . Se obtuvieron resultados similares en ratones C57Bl/6 negativos para la expresión de moléculas I-E. Estos resultados indican que el virus LA posee una fuerte actividad superantigénica, la que permitiría explicar su gran capacidad de amplificación en huéspedes susceptibles.

- 146. Mecanismos de amplificación de virus MMTV. II. Proliferación y reclutamiento linfocitario.** P. Bekinschtein, V. Buggiano, Irene Nepomnaschy, Paula Berguer, Virginia Francisco, Isabel Piazzon.

*IHHEMA, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.*

El virus LA, surgido por recombinación entre un virus exógeno y el Mtv-7, induce un importante aumento de células T CD4+ VB6+ reactivas al superantígeno (SAg) y de células B cuando el virus se inocula en la almohadilla plantar de ratones BALB/c. Se investigaron los mecanismos involucrados. A los 4 días de la inoculación de leche a) portadora de LA y b) libre de virus, se estudió mediante técnicas citofluorométricas: 1) el porcentaje de linfocitos

en fase de síntesis o mitosis (S+M), usando ioduro de propidio y Ac monoclonales y 2) el número de linfocitos marcados con FITC+ e inoculados por vía iv., en los ganglios drenantes. Los resultados fueron: 1) células IgG+: a)  $3\pm0.2(4)$  vs b)  $0.9\pm0.2(4)$ ; T VB6+: a)  $16\pm1(3)$  vs b)  $1.8\pm0.2(3)$ ; TVB10+: a)  $1.4\pm0.2(3)$  vs b)  $1.1\pm0.2(3)$  (% de células en (S+M) $\pm$ SD(n) y 2) células IgG+: a)  $49.9\pm3(3)$  vs b)  $15\pm1(3)$ ; T VB6+: a)  $24\pm3(3)$  vs b)  $4\pm0.3(3)$  y TVB10+: a)  $2.3\pm0.3(3)$  vs b)  $2.2\pm0.2(3)$  (número absoluto de células FITC+ ( $x10^{-3}$ ) $\pm$ SD(n)). Se concluye que el virus LA induce tanto la proliferación como el reclutamiento de los clones T reactivos al SAy y de células IgG+.

- 147. Frecuencia de Ag NORs en los cromosomas 3, 11 y 12 en ratas Wistar de 21 y 60 días de edad y en las que han sufrido déficit proteico severo al destete (LP).** Sofía Olmos, M. Gabriela Márquez, M. Estela Roux.

*Inmunología Celular, Depto Ciencias Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Buenos Aires.*

Hemos demostrado que los animales (LP) presentan alteraciones profundas en timo y sistema inmune de mucosas. En el presente trabajo se estudió el efecto que el déficit proteico severo tenía sobre la actividad de los genes ribosómicos. Esta puede ser detectada por marcadores específicos, que son las proteínas de las regiones organizadoras nucleolares (NOR); reveladas por tinción con plata en cromosomas metafásicos (en *Rattus norvegicus*  $n=42$ , los pares cromosómicos que presentan NOR son el 3, 11 y 12). Se realizaron preparados cromosómicos con células de médula osa de ratas (LP), 21 (destete) y 60 días de edad. Resultados: ( $X\pm ES$ ,  $n=5$ ) en ratas LP vs 21 vs 60. 1) Número de metafases cada 500 células:  $11.8\pm1.2$  vs  $19.0\pm0.7$  vs  $16.2\pm1.2$ ,  $p=0.004$ . 2) Número de células  $\times 10^6/ml$ :  $0.9\pm0.11$  vs  $1.72\pm0.46$  vs  $3.50\pm0.46$ ,  $p=0.001$ . 3) Frecuencia de pares cromosómicos con NOR en el par 3:  $25.0\pm1.7$  vs  $58.0\pm6.2$  vs  $49.9\pm4.4$ ,  $p=0.02$ ; y para los pares 11 y 12,  $p=ns$ . Conclusión: la deficiencia proteica severa provoca no solo diferencias significativas en el número de metafases encontradas en células de médula osa en LP sino también en la frecuencia de los pares cromosómicos 3 expresando NOR. (Financiado por FA 057)

- 148. Infección de células mononucleares periféricas (CMP) normales por sobrenadantes (SN) de cultivos primarios de CMP-HIV+.** Beatriz Ruibal-Ares, Graciela Méndez, Patricia Baré, Valeria Judkowsky, R. Pérez Bianco, M. Tezanos Pinto, María M.E. de Bracco.

*IHHEMA, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.*

Mediante el cultivo prolongado de CMP estudiaremos: 1) la recuperación de HIV a partir de cultivos de CMP de pacientes HIV+; 2) la capacidad infectiva de los SN de CMP-HIV+ sobre cultivos de CMP normales (N). Se cultivaron CMP de 8 pacientes hemofílicos HIV+ (CDC, grupos A, B, C) y de 10 N. Se cosechó SN de CMP-HIV+ entre los días 4 y 28 de cultivo y se probó su infectividad sobre CMP-N precultivadas 3-14 días midiendo p24 por ELISA. Las CMP se permeabilizaron y tiñeron con anti-p24 monoclonal (KC57-FITC). La carga viral de HIV (CV) en plasma se midió por RT-PCR y se expresó en log. En 2 pacientes (A3, CV: 4.8; B3, CV: 5.4) sólo los SN previos a los 12 días de cultivo fueron infectivos para CMP-N (p24: 30-33 pg/ml). Los SN de 2 pacientes B2 con alto título de p24 desde el día 7 hasta el 30 (160-600 pg/ml) fueron altamente infectivos. En 3 pacientes (A1,

A2, B2) con menor CV (2.63-3.41) y 1 B2 con CV negativa luego de 9 meses de tratamiento combinado, sólo los SN de mas de 12 días fueron infectivos. Por inmunofluorescencia sólo las células de la serie monocito/macrosfágica (M/M) eran p24+. Este procedimiento puede resultar útil para evaluar la persistencia de M/M infectadas en pacientes con CV negativa.

**149. Aumento de la proliferación de linfocitos murinos inducida por sobrenadante de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. M. Paulí, C. Anesini y E. Borda.**

Cát. Farmacología, F.O.U.B.A. y CEFYBO-CONICET, Buenos Aires.

El *A. actinomycetemcomitans* es un microorganismo asociado a diferentes formas de enfermedad periodontal destructiva. En un trabajo anterior se evaluaron condiciones de cultivo para un efecto proliferativo máximo. El objetivo del presente trabajo fue el análisis de los mecanismos bioquímicos implicados en el aumento de la proliferación (AP) de linfocitos normales extraídos de ganglios linfáticos de ratón en presencia de sobrenadantes (SN) de *A. actinomycetemcomitans* (*Aa*) ATCC 43718 (Y4). Para ello, se utilizaron inhibidores de vías enzimáticas relacionadas con la modulación de la proliferación celular. Los SN de *Aa* se obtuvieron por centrifugación (cultivo en fase estacionaria de crecimiento) y posterior filtrado. Observamos que el efecto estimulante de la proliferación celular fue parcialmente revertido por inhibidores de la ciclooxygenasa (% de estimulación control: 314 ± 20,2; n=5; INDO 10<sup>-6</sup> M: % de estimulación = 163 ± 23,1; n=4) y aumentado por inhibidores de la lipooxigenasa (% estimulación control: 323 ± 37; n=4; NDGA 10<sup>-6</sup> M: 620 ± 8; n=5). El efecto de INDO fue revertido por PG serie E (10<sup>-9</sup> M). L-NMMA (5x10<sup>-4</sup> M), TFP (5x10<sup>-6</sup> M) y staurosporina (10<sup>-9</sup> M) disminuyeron el AP. NCDC (10<sup>-5</sup> M) no modificó el AP. Podemos concluir diciendo que SN de *Aa* inducen un aumento de la proliferación de linfocitos normales. Estas acciones estarían relacionadas en parte, con la liberación de PGs, NO y la participación del sistema calcio/calmodulina.

**150. Efecto del interferón α2b como terapia adyuvante sobre una línea celular resistente a multidroga. M. Fernanda Lucero Gritti, Mariana Beviacqua, H. Bordenave, Lía S. Rumi.**

IBYME- CONICET, Buenos Aires.

**Introducción:** La resistencia a multidroga (MDR) se define como la capacidad de ciertas células para disminuir la concentración intracelular de drogas antineoplásicas (DA) a niveles subletales. Dicho fenómeno está frecuentemente asociado con la hiperexpresión de la glicoproteína de membrana P-170 que actúa como bomba extrusora de la droga. Es terreno de nuevas investigaciones el estudio de compuestos moduladores de resistencia tumoral que puedan revertir dicho fenómeno. Por otra parte, se conoce que una gran variedad de respuestas biológicas tanto en el tumor como en el huésped, pueden alterarse por el interferón (IFN). **Objetivos:** Estudiar el efecto del IFNα 2b como modulador de la resistencia a multidroga *in vitro* de una línea tumoral humana MDR Θ y evaluar su efecto como adyuvante en combinación con una droga del grupo de las antraciclinas. **Metodología:** Se utilizó la línea celular de adenocarcinoma de colon humano HCT-15 intrínsecamente resistente. Mediante inmunohistoquímica se observó que expresa la glicoproteína P-170. Se eligió la doxorubicina (dox) como DA y el interferón α2b como agente sensibilizante, evaluándose la quimiosensibilidad del tratamiento mediante inhibición de la proliferación por incorporación de timidina tritiada y por el método colorimétrico del tetrazolium (MTT). **Resultados:** El interferón α 2b tiene la capacidad de incrementar la toxicidad de la dox sobre las células HCT-15 debido a que se observó una inhibición de la proliferación del 46% ± 1.1 (ES%) con respecto al control sin tratar (P=0.0132) y una disminución de la absorbancia del 41% ± 4.2 (ES%) en el MTT comparado con el control sin tratamiento (P=0.0012). **Conclusiones:** El uso de interferón α2b como terapia adyuvante puede ser de utilidad en combinación con la dox, debido a que en nuestro modelo *in vitro*, potencia 2 veces el efecto de la dox.

bición de la proliferación por incorporación de timidina tritiada y por el método colorimétrico del tetrazolium (MTT). **Resultados:** El interferón α 2b tiene la capacidad de incrementar la toxicidad de la dox sobre las células HCT-15 debido a que se observó una inhibición de la proliferación del 46% ± 1.1 (ES%) con respecto al control sin tratar (P=0.0132) y una disminución de la absorbancia del 41% ± 4.2 (ES%) en el MTT comparado con el control sin tratamiento (P=0.0012). **Conclusiones:** El uso de interferón α2b como terapia adyuvante puede ser de utilidad en combinación con la dox, debido a que en nuestro modelo *in vitro*, potencia 2 veces el efecto de la dox.

**151. Estudio del estrés oxidativo a nivel celular en poblaciones de macrófagos alveolares (AM) en función de la edad. D.R.Tasat y BM de Rey.**

Dpto. Radiobiología, CNEA y ECYT, UNSAM, Buenos Aires.

La senescencia ha sido asociada con anomalías morfológicas como disminución de la capacidad funcional y aumento de la susceptibilidad a infecciones del pulmón. Los AM son dentro del alvéolo pulmonar células que modulan la respuesta inflamatoria mediante numerosos productos de secreción entre los cuales se encuentran los metabolitos del oxígeno. A pesar que la generación de especies reactivas del oxígeno son consideradas esenciales en la actividad citotóxica en fagosomas y una función inmune primaria, aun existen controversias sobre su variación a través de la edad del animal. Con tal fin determinamos la producción del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) mediante la reducción de formazana a partir de sales de tetrazolium. La respuesta celular a nivel individual en AM obtenidos por lavado bronquealveolar en ratas jóvenes (J) y adultas (A) se analizó por medio de un analizador de imágenes IBAS, Kontron. Se estudiaron 2 condiciones: i) Control y ii) Estimulados con PMA. El porcentaje de AM que produjeron O<sub>2</sub><sup>-</sup> se encontró reducido en ratas J comparado con A tanto en controles (13.7 ± 2.3% vs. 23.3 ± 6.24%) como en estimulados (34.3 ± 3.3% vs. 50.0 ± 2.8, p < 0.01). La baja producción de metabolitos del oxígeno en AM de ratas jóvenes podría deberse a la elevada actividad de enzimas antioxidantes presentes. Este método permitió caracterizar la población de AM a nivel individual en función de la edad en cuanto a la generación de anión superóxido.

**152. Expansión de células CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> en el bazo de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*. M.I. Antúnez, R.L. Cardoni, K-O. Grönvik.**

Instituto Nacional de Parasitología "Dr. M. Fatale Chabén"; Departamento de Investigación en Vacunas, The National Veterinary Institute, Uppsala, Buenos Aires.

Se estudió el fenotipo de las células no-adherentes del bazo de ratones infectados con *T. cruzi*. A los 20 días pi, pico de parasitemia, se encontró una disminución de la proporción de células CD4<sup>+</sup> (C, control: 45±2; I, infectado: 25±1), CD8<sup>+</sup> (C: 18±1; I: 13±1), y un aumento de las CD4 CD8<sup>+</sup> (C: 34±2; I: 62±2). Con el objeto de realizar estudios funcionales, se aislaron las células CD4 CD8<sup>+</sup> con anticuerpos monoclonales unidos a bolillas magnéticas. La población aislada presentó morfología de linfocitos grandes granulares y fue responsable de la mayor actividad NK y

producción de IFN- $\gamma$  ante concanavalina A observada durante la infección aguda con *T. cruzi*. Por otro lado, las células ejercieron una acción inhibidora sobre la reacción mixta de linfocitos alógenica. Los resultados sugieren que estas células participan en la resistencia y modulación de la respuesta inmune.

- 153. Evidencias sobre la interacción bidireccional entre el sistema inmune (SI) y el eje tiroideo (ET).** Alicia Klecha, Ana M. Genaro, A. Lysionek, R. Caro, Déborah Sragowicz, Graciela Cremaschi.

*Laboratorio de Radioisótopos, Fac. Farmacia y Bioquímica, UBA - CEFYBO, CONICET. Buenos Aires.*

Se ha descripto en animales hipotiroides un déficit en su función immunológica. Sin embargo no hay una demostración fehaciente de la interrelación entre el SI y el ET. En el presente trabajo se estudió la comunicación bidireccional entre ambos sistemas en un modelo de inmunización alógenica murina. Se observó un incremento en la concentración de T3 (ng/ml) y T4 ( $\mu$ g/ml) (Controles-C: T3= 74.2 ± 7.1, T4= 2.89 ± 0.45 vs. inmunizados T3= 117.5 ± 8.2, T4= 4.11 ± 0.36, p<0.05). También se comprobó que la T4 potenció la proliferación linfocitaria inducida por un estímulo alógenico "in vitro" (índice de estimulación C= 4.2 ± 0.8 vs. T4= 7.6 ± 1.1, n=4). Asimismo observamos que el tratamiento crónico "in vivo" con T4 indujo un incremento en el título de aloanticuerpos durante el transcurso de la aloinmunización. Podemos concluir que la inmunización induce un incremento en la actividad de la glándula tiroidea la que a su vez regula positivamente la respuesta inmune. Estos resultados puntualizan la existencia de un circuito de control bidireccional entre el ET y el SI.

- 154. Acción de la tiroxina (T4) sobre la proliferación linfocitaria.** Alicia Klecha, Graciela Cremaschi, A. Lysionek, R. Caro, C. Davio, Ana M. Genaro.

*Lab. Radioisótopos, Fac. Farmacia y Bioquímica, UBA-CEFYBO, CONICET. Buenos Aires.*

Se ha descripto la influencia de las hormonas tiroideas sobre la respuesta inmune. Sin embargo el mecanismo a través del cual ejercen su influencia permanece sin esclarecer. En el presente trabajo comprobamos que el tratamiento "in vivo" de T4 en ratones indujo un aumento de la reactividad celular. Así, las células linfáticas provenientes de estos animales mostraron: a) Una ma-

yor respuesta proliferativa frente al LPS (7.5  $\mu$ g/ml) (dpm Control-C: Basal -B= 3876±429, LPS=20015±978; T4, B=5639±715, LPS=47729±3589; n=5). b) Una mayor respuesta proliferativa frente a Concanavalina A (ConA, 2  $\mu$ g/ml) (C, B=2543±328, ConA= 143825±11320; T4, B=3629±440, ConA= 225640±23829; n=4). c) Una mayor respuesta frente a un estímulo alógenico (aloAg) (C, B= 3628±289, aloAg= 18745±1945; T4, B=4827±429, aloAg= 38044(613; n=4). Las células provenientes de los animales tratados mostraron una menor respuesta al incremento de AMPc inducido por isoproterenol (ISO, 10<sup>-6</sup>M) (incremento respecto del basal: C=11, T4=4). Por otra parte linfocitos tratados "in vitro" con T4 mostraron una proliferación similar a la proveniente de animales tratados. Se concluye que la hormona tiroidea ejerce un efecto inmunoestimulante directo sobre las células linfoides a través de la modulación de los niveles intracelulares de AMPc.

- 155. Efecto de la Fluoxetina (FLU) sobre la proliferación de linfocitos T humanos (LT). Activación de Protein Quinasa C (PKC) y movilización del calcio.** Valeria Ayelli Edgar- AM Genaro- G Cremaschi- L Sterin-Borda.

*CEFYBO-CONICET. Buenos Aires.*

Anteriormente demostramos que la Flu ejerce un efecto inmunomodulador sobre la actividad proliferativa de LT, potenciando el efecto proliferativo de dosis submitogénicas de Concanavalina A (Con A) (1 $\mu$ g/ml) e inhibiendo la proliferación inducida por concentraciones mitogénicas de Con A (2 $\mu$ g/ml). En el presente trabajo estudiamos las señales tempranas involucradas en la proliferación celular: participación del calcio y actividad de PKC. Comprobamos que la Flu 10<sup>-7</sup> M incrementa la proliferación producida por 1 $\mu$ g/ml de Con A induciendo una mayor traslocación de la PKC (pmol/min/10<sup>7</sup> cel). Valores citosol/membrana: basal: 5.04±0.5/ 0.56±0.05; Con A 1mg/ml : 2.96±0.3/ 2±0.2; Con A 1 $\mu$ g/ml + Flu 10<sup>-7</sup> M: 1.92±0.2/ 4±0.4 (n=5). Por otra parte la Flu disminuye la proliferación de 2 $\mu$ g/ml de Con A por inducir la degradación proteolítica de la PKC medida por la formación de protein quinasa M (PKM) (pmol/min/10<sup>7</sup> cel). Valores PKM/PKC en membrana: basal: 0.01±0.1/ 0.56±0.5; Con A 2mg/ml : 0.1±0.5/ 3.76±0.3; Con A 2 $\mu$ g/ml + Flu 10<sup>-5</sup> M: 0.8±0.1/ 0.16±0.01 (n=5). El ionóforo de calcio A23187 mimetiza el efecto de la Flu. Concluimos que la Flu modularía el influxo de calcio, el cual influenciaría la traslocación de PKC, modulando así la respuesta celular.

## Reproducción

- 156. Regulación de la función esteroidogénica de la célula de Leydig por una vía dependiente de ceramida.** Silvina Meroni, Daniela Cánepa, Eliana Pellizzari, Helena Schteingart, Selva Cigorraga.

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

Se ha encontrado que algunos receptores de membrana utilizan la hidrólisis de esfingomielina como sistema de transducción. La ceramida producida funciona como segundo mensajero activando distintos efectores que promueven la respuesta biológica específica. El objetivo de este trabajo fue estudiar la participación de este sistema de transducción en la regulación de la función esteroidogénica de la célula de Leydig. Para ello las células de Leydig fueron incubadas por 3 hs con análogos permeables de ceramida (C2 y C8:10 $\mu$ M) y un inhibidor de la ceramidasa (MAPP: 10 $\mu$ M) en presencia o ausencia de hCG (10ng/ml) o dbAMPc (1mM). La testosterona (T) producida fue determinada por RIA y los resultados se expresaron como ng/10<sup>6</sup> cel/3hs (X±DS n=3, \*p<0,01). El tratamiento con las distintas drogas no modificó los niveles basales de T mientras que produjo una inhibición del estimulo por hCG (hCG: 40,1±5,0; hCG+C2: 18,1±2,1\*; hCG+C8: 23,8±4,8\*; hCG+MAPP: 14,3±0,2\*) o por dbAMPc (dbAMPc: 30,2±4,0; dbAMPc+C2: 16,9±1,2\*; dbAMPc+MAPP: 17,9±4,0\*). No se observaron modificaciones en la conversión de pregnenolona (P<sub>s</sub>:2 $\mu$ M) a T por los tratamientos (P<sub>s</sub>: 66,3±5,5; P<sub>s</sub>+C2: 59,6±4,0). Los resultados obtenidos sugieren que una vía dependiente de ceramida participa en la regulación de la respuesta esteroidogénica en la célula de Leydig, en una etapa que se encuentra entre la producción de AMPc y P<sub>s</sub>.

- 157. Efecto de la proteína caltrin (calcium transport inhibitor) de rata sobre el proceso de fertilización.** A. Dematteis\*, DJ Cohen, ML Novella\*, CE Coronel\* y PS Cuasnicú.

*Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires. Fac.Cs. Médicas, UNC, Córdoba.*

Caltrin es una proteína básica de vesícula seminal (Mw ≈ 7 kDa) que se une específicamente a la región acrosomal y cola del espermatozoide epididimario de distintas especies, inhibiendo la entrada de calcio a la célula. Debido a la importante participación del calcio en las diferentes etapas conducentes a la fertilización (capacitación, reacción acrosomal, hiperactivación) examinamos el efecto de esta proteína sobre el proceso de fertilización. Para ello, desarrollamos la compleja técnica de fertilización "in vitro" de rata, evaluando posteriormente el efecto de la presencia de caltrin (de rata) sobre el porcentaje de ovocitos fertilizados observados a las 24 hs de incubación. Los resultados indicaron que la presencia de caltrin durante la co-incubación de las gametas produjo una disminución significativa (p<0.05), y dependiente de la concentración, en el porcentaje de ovocitos fertilizados (0.01 $\mu$ g/ $\mu$ l: 98%; 0.05 $\mu$ g/ $\mu$ l: 19%; 0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l: 1%) a pesar de producir un aumento en el número de espermatozoides unidos por ovocito. Dicha inhibición estaría mediada efectivamente por la proteína dado que no

se observa en presencia de una proteína control (ovoalbúmina: 78%) y puede ser revertida por la remoción de caltrin del medio 6 hs luego de iniciada la co-incubación (62%). Estos resultados indicarían que caltrin, a través de su acción sobre el transporte de calcio, cumpliría una importante función regulatoria de la capacidad fertilizante del espermatozoide. Actualmente nos encontramos investigando si la participación de caltrin ocurre a nivel de la capacitación, reacción acrosomal y/o interacción de gametas.

- 158. Participación de la proteína epididimaria DE en la etapa de interacción espermatozoide-zona pellúcida.** DJ Cohen, A. Dematteis y PS Cuasnicú.

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

La proteína epididimaria DE se asocia a la región dorsal de la cabeza del espermatozoide (esp.) de rata durante la maduración, migra al segmento equatorial (SE) con la reacción acrosomal (RA) y participa en el proceso de fusión de gametas. Su localización original en la región dorsal sugiere su potencial participación en la etapa de interacción con la zona pellucida (ZP). Para evaluar dicha posibilidad, se desarrolló la compleja técnica de fertilización de ovocitos de rata con ZP. Utilizando esta técnica se estudió el efecto del anticuerpo polyclonal anti-DE sobre la fertilización, observándose que dicho anticuerpo es capaz de producir una inhibición significativa (p<0.001) en el porcentaje de ovocitos fertilizados respecto a los controles incubados con suero de conejo normal (6% vs. 66%) o medio solo (6% vs. 91%). Como otra aproximación al tema, ovocitos con ZP fueron incubados con proteína DE purificada previo a la inseminación. La presencia de DE produjo una completa inhibición en el porcentaje de ovocitos penetrados respecto a los controles con ovoalbúmina (0% vs. 78%) o medio solo (0% vs. 70%). Finalmente, se observó que el agregado de ZP solubilizada (inductor fisiológico de la RA), a esp. capacitados produce un rápido aumento en el porcentaje de esp. con redistribución de DE al SE (5 ZP/ $\mu$ l: 46% vs 30%, p<0.001). En conjunto, estos resultados indicarían que DE cumpliría una doble función: localizada en la región dorsal del acrosoma participaría en la etapa de interacción con la ZP, la cual induciría su migración al SE, localización en la cual participaría en la etapa de fusión de gametas.

- 159. Participación de la óxido nítrico sintasa en la reacción acrosomal inducida del espermatozoide humano.** MB Herrero, JM Viggiano, E Cebral, S Pérez Martínez, P Morales, A Salgado, MAF Gimeno.

*Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO) Serrano 669 (1414) Buenos Aires.*

Trabajos realizados en nuestro laboratorio han demostrado la presencia de la óxido nítrico sintasa (NOS) en el acrosoma de espermatozoides de ratón y humanos y la participación de esta enzima en el proceso de fertilización *in vitro*. En este trabajo investigamos si la NOS interviene en el proceso de reacción

acrosomal inducida por fluido folicular (FF) en espermatozoides humanos. A espermatozoides humanos, seleccionados en un medio capacitante, se les adicionaron diferentes inhibidores de la NOS por 30 min y luego se agregó el FF (20%) durante otros 15 min. El porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados se determinó mediante la doble tinción Pisum Sativum-HOS. Altas concentraciones de L-NAME (5 y 1 mM) inhibieron la reacción acrosomal inducida por FF en un 50% y 37% respectivamente. El enantiómero inactivo, D-NAME no produjo inhibición de la exocitosis acrosomal. Por otro lado, el inhibidor L-NMMA (1 y 0.1mM) bloqueó significativamente la reacción acrosomal *in vitro* (43% y 31.2%). Estos resultados sugieren que la NOS en espermatozoides humanos está involucrada en la exocitosis acrosomal inducida por FF y confirman la similitud con el modelo de espermatozoide de ratón.

- 160. Falta de expresión del gen de la aromatasa (CYP19) en el testículo humano prepupal (hPP) en reposo y estimulación transitoria de la secreción de estradiol (E2) *in vitro* al iniciarse la esteroidogénesis (IE).** N. Saraco, E. Berensztein, A. Dardis, M.A. Rivarola y A. Belgorosky.

Lab. de Invest., H. Garrahan, Buenos Aires.

Se ha postulado que los estrógenos pueden ejercer una regulación negativa sobre la síntesis de testosterona (T) testicular. La expresión del gen CYP19 en el testículo hPP no ha sido estudiada, aunque se ha establecido que las células de Leydig humanas adultas poseen actividad aromatasa. En este trabajo hemos estudiado por RT-PCR la presencia de mRNA del CYP19 en 7 testículos PP entre 0.08 y 7 años (a) y uno puberal (P) de 15 a, obtenidos de necropsias. Además, células testiculares de 12 pacientes PP (de 0.05 a 7 a de edad) y de 2 P de 15 a de edad fueron mantenidas en cultivo durante 2 días en presencia de suero fetal bovino al 10%, más 4 días adicionales en medio libre de suero. La secreción de T y de E2 se determinó por RIA los días 2, 4 y 6 de cultivo, en 6 de los 12 PP, y el mRNA del CYP19 en el día 6 en los 14 cultivos. No se encontró mRNA del CYP19 en ninguno de los 7 tejidos PP ni en los 12 cultivos PP en el día 6. Sin embargo el mRNA del CYP19 estuvo presente en el tejido P y en los 2 cultivos P. Como ya fue descripto, las células testiculares PP en cultivo incrementaron la T entre el día 2 y 6 de cultivo, presumiblemente bajo la influencia de los componentes del suero. Sorprendentemente, se detectó secreción de E2 en el día 2 en cantidades equimolares con la T, la que desapareció los días 4 y 6. Se concluye que las células testiculares hPP en reposo no expresan el gen CYP19. Sin embargo, en un modelo de IE *in vitro* se observó una estimulación transitoria de la secreción de E2. Se postula la existencia de un mecanismo de represión del gen CYP19 durante la pubertad. Al iniciarse la esteroidogénesis P, habría una modulación regulatoria de la expresión de este gen, predominando al principio un efecto negativo para posibilitar la síntesis de T.

- 161. Concentración de Fibronectina (FN) en medios condicionados de embriones humanos (MCEH) y su correlación con la viabilidad del embarazo.** Rosa Inés Barañao\*, Alejandra Piazza \*\* y Ester Polak de Fried\*\*

\*Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET y \*\* CER- Instituto Médico, Buenos Aires

La FN es una glicoproteína de adherencia de la matriz extracelular que podría jugar un papel importante en el proceso de implantación y diferenciación embrionaria en humanos. El objetivo del presente estudio fue evaluar la concentración de FN en MCEH de 24 horas y la posible relación entre niveles de FN y viabilidad del embarazo, como así también la relación entre FN e IL-1 $\beta$  y FN con morfología embrionaria. Para ello se desarrolló un ELISA para FN en el cual la mínima concentración detectable fue 5 ng/ml. Se analizaron 94 muestras de MCEH (medio que rodea a los embriones en estadio de 2-4 células) y 6 muestras controles (medio de cultivo celular sin contacto con embriones). Los niveles de IL-1 $\beta$  se determinaron usando un "kit" comercial de alta sensibilidad. Se observó que en 45 muestras correspondientes a embriones que produjeron embarazo (MCEH-E) la concentración de FN fue de  $2171 \pm 410$  ng/ml, mientras que en 49 MCEH de embriones que no produjeron embarazo (MCEH-NE) fue de 670 (82 ng/ml ( $p < 0.001$ ) y en las muestras controles fue de 90 (10 ng /ml ( $p < 0.001$  vs MCEH). La concentración promedio de IL-1 $\beta$  fue de  $4 \pm 1$  pg/ml en MCEH-E mientras que en MCEH-NE fue de  $0.4 \pm 0.3$  pg/ml. La concentración de FN fue mayor en los MCEH correspondientes a embriones con mejor morfología. De acuerdo a los resultados obtenidos existiría una estricta relación entre niveles de FN y viabilidad de embarazo. La producción de FN podría ser inducida por la IL-1 $\beta$  embrionaria.

- 162. Alteración en la proporción entre sexos en embarazos obtenidos por la transferencia de los blastocistos más desarrollados logrados por fertilización *in vitro* y cocultivo.** Carlos J. Quintans, M.J. Donaldson, M.C. Carou, L.A. Blanco, R.S. Pasqualini.

Halitus, Instituto Médico, Buenos Aires.

El objetivo fue detectar diferencias en la velocidad de desarrollo entre embriones humanos de distinto sexo. Se realizó un estudio retrospectivo en un grupo de 10 mujeres embarazadas por la transferencia de blastocistos. La edad promedio era de  $30.3 \pm 2.8$  años (Rango 24 a 34). Se estimuló con acetato de leuprolida, hormona folículo estimulante, gonadotrofina de mujer menopáusica, y gonadotrofina coriónica. Los ovocitos se recolectaron por punción ecográfica transvaginal. En 5 casos se usó fertilización *in vitro* convencional y en otros 5 microinyección. Se usó medio HTF para fertilización y cultivo hasta 4 células, y luego los preembriones se transfirieron a una monocapa de células Vero en medio α-MEM cultivando hasta un máximo de 5 días. Dos o tres blastocistos se transfirieron al útero, eligiendo los más desarrollados. Los no transferidos se criopreservaron. El sexo se determinó en 9 casos al nacimiento y en uno por biopsia de vellosidades coriales. En las 10 pacientes hubo 24 sacos embrionarios por ecografía, de estos, 3 se desvanecieron en el primer trimestre. De los 21 restantes, 15 eran niños (71,4%) y 6 niñas (28,6%), lo que representa una diferencia significativa a nivel 0.035. En todos los embarazos había por lo menos un varón y en el 50% solo varones. Los resultados indican que como en otros mamíferos los embriones humanos también mostrarían diferente velocidad de desarrollo según su sexo.

- 163. Efecto de los carbohidratos sobre la fusión de las membranas plasmáticas del espermatozoide y ovocito de rata.** Rubén H. Ponce.

Química Biológica, Fac. de Odontología y Ciencias

*Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.*

Los mecanismos moleculares involucrados en la adhesión y fusión entre las membranas plasmáticas del espermatozoide y el ovocito son poco conocidos. El propósito de este estudio fue examinar la posible participación de carbohidratos en la fusión entre los gametos de rata. Se obtuvieron espermatozoides de la porción distal del epidídimo de rata y se capacitaron en una solución Krebs-Ringer modificada, con albúmina de suero bovino 0,4%. Los ovocitos se obtuvieron de ratas superovuladas. Para determinar si los azúcares inhibían competitivamente el proceso de fusión, los ovocitos sin zona pelúcida fueron inseminados con espermatozoides capacitados en presencia de carbohidratos diferentes. Los resultados mostraron que los aminoazúcares D-glucosamina 10mM y D-galactosamina 10 mM, y los polisacáridos polisulfatados fucoidán 5 mg/ml y dextrán sulfato 400 mM, producen una inhibición significativa ( $p<0,01$ ) en el porcentaje de ovocitos fecundados. Además, el número de espermatozoides que penetra en cada ovocito disminuye significativamente ( $p<0,001$ ) a valores de  $0,02\pm0,02$  (D-glucosamina),  $0,05\pm0,05$  (D-galactosamina),  $0,0\pm0$  (Fucoidán) y  $0,04\pm0,04$  (Dextrán sulfato), respecto a  $1,00\pm0,17$  (control). Estos datos sugieren dos mecanismos de unión para la interacción entre los gametos, basado sobre una inhibición por carbohidratos específicos y por una orientación y densidad de carga específica. Financiado por CONICOR y la Fundación Rockefeller.

**164. Determinación de la presencia de sitios de adhesión para glucosamina en espermatozoides de hamster.** Rubén H. Ponce y Rodolfo D. Pereira.

*Cátedra de Química Biológica, Facultades de Odontología y Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.*

La fusión entre las membranas plasmáticas del espermatozoide y el ovocito es inhibida por carbohidratos. Glucosamina permite que el espermatozoide pueda adherirse a la superficie del ovocito pero inhibe su capacidad fecundante. El propósito de este trabajo es definir el mecanismo por el cual glucosamina interfiere la fecundación. Se obtuvieron espermatozoides por punición de la porción distal del epidídimo de hamster y se capacitaron en una solución Tyrode modificada (m-TALP-3) conteniendo 15 mg/ml BSA (albúmina sérica bovina). BSA-glucosamina fue utilizada para producir un derivado fluorescente, uniéndose covalentemente a isotiocianato de fluoresceína (FITC). Este compuesto mostró un índice de relación molar (FITC/BSA-glucosamina) de 0,48 ( $\Delta 495/280$  nm). Los espermatozoides, capacitados o no, se incubaron durante 15 minutos con el conjugado y se lavaron dos veces con m-TALP-3-BSA. La marcación específica se visualizó por microscopía de fluorescencia. Los resultados obtenidos mostraron una marcación evidente en espermatozoides capacitados, localizándose fundamentalmente en cabeza y pieza media. Estos datos sugieren fuertemente la existencia de un sitio receptor para glucosamina en espermatozoides, debiendo determinarse en un futuro las implicancias que puede tener en la capacidad fecundante del espermatozoide. Financiado por CONICOR y la Fundación Rockefeller.

**165. El IGF-1 modula la síntesis de testosterona (T) en células testiculares humanas (hPP) en cultivo.** E. Berensztein, N. Saraco, A. Belgorosky y M.A. Rívarola.

*Lab. de Investigación, Hosp. Ped. Garrahan, Buenos Aires.*

La regulación endocrina y paracrína de la activación testicular y el aumento de la T sérica en los primeros meses (M) de vida postnatal así como de la posterior quiescencia del testículo hPP aun no ha sido claramente comprendida. Previamente hemos descrito que la secreción basal (b) de T en cultivo primario de células testiculares hPP obtenidas de necropsias de niños entre 1-7 M era mayor que la de niños entre 12-36 M y que el Grupo (G) de menor edad conservaba la capacidad de respuesta al estímulo con hLH, hFSH y hGH. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la estimulación con IGF-1 (50 ng/ml) sobre la esteroidogénesis al 6º día de cultivo en 3 G de edades, G1: recién nacidos de 4-10 días de vida, G2: 1-7 M y G3: 12-36 M. Se evaluó la secreción de T, androstenediona ( $\Delta$ ) y dehidroepiandrosterona (D) en los medios condicionados b ó bajo estímulo con hLH ó rIGF-1. Se estimó la actividad de la enzima 3 $\beta$ -HSD por la relación (T +  $\Delta$ )/D y de la 17 $\beta$ -HSD por T/ $\Delta$ . La respuesta a los estímulos fue expresada como % de la condición b. Se observó que el rIGF-1 estimuló significativamente la secreción de T en los G1, G2 y G3 ( $X\pm SD$ : 391 ± 85,8, n=4, 1032 ± 1235, n=8, y 277 ± 214, n=5, respectivamente,  $p<0,05$ ) mientras que la hLH sólo estimuló en el G2 (532 ± 563, n=8,  $p<0,05$ ). El efecto del rIGF1 fue dosis dependiente. El rIGF1 estimuló la actividad 3 $\beta$ -HSD en los G1 y G2 (255 ± 63, n=3, y 636 ± 381, n=6, respectivamente,  $p<0,05$ ), mientras que la hLH sólo lo hizo en G2 (369 ± 288, n=7,  $p<0,05$ ). No se observaron en ninguno de los 3 G cambios en la actividad 17 $\beta$ -HSD ni con hLH ni con IGF1. Se concluye que el IGF-1 es un modulador de la biosíntesis de T durante la activación postnatal del testículo humano. La acción sería probablemente a nivel de la 3 $\beta$ -HSD aunque no se puede descartar su efecto a otros niveles.

**166. Efecto de EGF, GH y Testosterona sobre las proteínas transportadoras de IGFs (IGFBPs) en cultivos de células de Sertoli (SC).** Análisis por Western Ligand Blot (WLB).

Patricia Pennisi, Helena Schteingart, R. Iacono, Selva Cigorraga, H. Jasper.

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

Las IGFBPs son capaces de unir IGFs con alta afinidad y modulan la biodisponibilidad de los mismos. En SC se ha demostrado que FSH aumenta la producción de IGF-I y disminuye la de IGFBP3. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la regulación por hormonas y factores de crecimiento de las IGFBPs producidas por SC. SC provenientes de ratas de 20 días de edad fueron cultivadas con oFSH (100 ng/ml), GH (100 ng/ml), Testosterona (T, 100 nM), EGF (50 ng/ml) o IGF-I (50 ng/ml) durante 48 hs. En los medios condicionados se determinó la capacidad total de unión con  $^{125}I$ IGF-II (BC); asimismo dichos medios fueron analizados por WLB. Los resultados de BC de un experimento representativo de tres expresados como  $X\pm SD$ , cpm/ $\mu$ g DNA, fueron: basal: 179 ± 12; FSH: 86 ± 11\*, EGF: 287 ± 71\*, GH: 161 ± 14; T: 243 ± 11\*, n=3, \*  $p<0,01$ . Los ensayos de WLB mostraron incrementos en las bandas correspondientes a IGFBP3 luego de tratamientos con EGF, T, IGF-I y GH, mientras que el tratamiento con FSH provocó una disminución de las mismas. Estos resultados sugieren que las hormonas y factores de crecimiento analizados podrían en parte afectar la función testicular regulando los niveles de IGFBPs y por lo tanto la biodisponibilidad de los IGFs.

- 167. Efectos de las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  sobre células de Sertoli.** Helena Schteingart, Daniela Cánepa, Silvina Meroni, Eliana Pellizzari, Selva Cigorraga.

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

Las citoquinas que provienen de las células del sistema inmune y las que se producen localmente en el testículo poseen la capacidad de regular la espermatozogénesis. Las acciones de estas citoquinas, sobre las células de Sertoli (SC) no han sido aún estudiadas. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la acción de las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  sobre la funcionalidad de las SC. Para ello, cultivos de SC provenientes de ratas de 20 días de edad fueron tratados con TNF- $\alpha$  (T, 50ng/ml) o IL-1 $\beta$  (I, 30UI/ml) por 3 días. Se determinaron las actividades de  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa ( $\gamma$ -GTP) y aromatasa (E<sub>2</sub>) y la secreción de transferrina (Trf) y lactato. Todos los resultados se expresan como X±SD, n=4, \* p<0.01. El tratamiento con TNF- $\alpha$  estimuló la actividad de  $\gamma$ -GTP (basal (B): 19.7±3.1, T: 68.7±10.0\* pmol-p-N-anil/ $\mu$ gDNA/min); y la secreción de Trf (B: 46.8±9.1, T: 100.8±19.5\* ng/ $\mu$ gDNA) mientras que inhibió la producción de lactato (B: 8.0±0.7, T: 4.1±0.1\*  $\mu$ g/ $\mu$ gDNA) y la producción de E<sub>2</sub> (B: 47.9±3.8, T: 33.9±7.3\* pg/ $\mu$ gDNA). Resultados semejantes se obtuvieron en los cultivos tratados con IL-1 $\beta$ . Los resultados obtenidos sugieren que las citoquinas, además de tener la propiedad de regular la esteroidogénesis en las células de Leydig, tienen acciones marcadas sobre la funcionalidad de las células de Sertoli.

- 168. Participación de una vía dependiente de ceramida en la regulación funcional de la célula de Sertoli.** Daniela Cánepa, Silvina Meroni, Helena Schteingart, Eliana Pellizzari, Selva Cigorraga.

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

Se ha descripto un nuevo sistema de transducción que involucra la hidrólisis de esfingomielina. La ceramida producida funciona como segundo mensajero que produce la respuesta biológica específica. El objetivo de este trabajo fue estudiar la participación de este sistema de transducción en la regulación funcional de la célula de Sertoli. Para ello se utilizó un análogo permeable de ceramida (C2:10 $\mu$ M) y un inhibidor de la ceramidasa (MAPP: 10 $\mu$ M). Cultivos de células de Sertoli de ratas de 20 días fueron estimulados con las drogas en presencia o ausencia de FSH (100ng/ml). Los resultados se expresan como X±DS, n=3. La producción de transferrina (ng/ $\mu$ gDNA) disminuyó en condiciones basales (B: 23,9±5,9; C2: 12,6±2,9\*; MAPP: 12,0±2,8\*; \*p<0,01vsB) y bajo estímulo con FSH (FSH: 38,3±5,7; FSH+C2: 30,9±4,3\*; FSH+MAPP: 29,9±1,7\*; \*p<0,01vsFSH). La producción de lactato ( $\mu$ g/ $\mu$ gDNA) aumentó en condiciones basales (B: 5,3±0,8; C2: 20,8±3,5\*; MAPP: 28,8±4,3\*; \*p<0,01vsB) y en presencia de FSH (FSH: 11,9±1,1; FSH+C2: 19,8±1,5\*; FSH+MAPP: 35,9±4,4\*; \*p<0,01vsFSH). La actividad aromatasa estimulada por FSH se inhibió en presencia de C2 y MAPP, mientras que no se observaron efectos sobre la actividad de  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa. Los datos obtenidos sugieren que la vía dependiente de ceramida está presente en la célula de Sertoli y que participa en la regulación funcional de la misma.

- 169. Expresión de ICAM-1 Y LFA-1 en el desarrollo del orchitis autoinmune experimental (OAE).** S.E. Vianello, Berta Denduchis, Marta B. Casanova, Livia Lustig.

*Centro de Investigaciones en Reproducción, Fac. de Medicina, UBA.*

Con el objeto de determinar el papel que juegan las moléculas de adhesión(CAM's) en la OAE, se estudió la expresión de ICAM-1 y LFA-1 en linfocitos de sangre(S), ganglios linfáticos (G) y testículo (T). Se inmunizaron ratas con homogenado testicular y adyuvantes y se sacrificaron a los 2, 7, 30, 50 y 80 días. Como controles (C) se inmunizaron ratas con sol. fisiológica y adyuvantes. Linfocitos de S y G fueron incubados con AcMn anti-ICAM-1 y anti-LFA-1 y procesados para imunofluorescencia para su cuantificación por microscopía óptica (MO) y citometría de flujo (CF). La detección en el T se realizó por la técnica de la peroxidasa, en cortes de crióstato. Por MO y CF no se detectaron diferencias significativas entre ratas con OAE y C, a lo largo del tiempo, en la expresión de ICAM-1 y LFA-1 en S y G. Por ej., los datos obtenidos a los 30 días en G para LFA-1 por MO son: (OAE vs C) 39,3±17,3 vs 39,6±6,7; en S: 29,7±18,4 vs 31,4±1,1; para ICAM-1, en G: 28,1±15,9 vs 30,8±14,7; en S: 17,3±11,9 vs 20,2±10,5. Por CF, para LFA-1, en G: 88,4±20,8 vs 95,2±6,0; en S: 89,3±13,0 vs 84,8±22,5; para ICAM-1, en G: 57,4±15,4 vs 56,5±19,3; en S: 56,9±12,5 vs 57,4±27,7. En el testículo se observaron células endoteliales ICAM-1+ y linfocitos LFA-1+ detectándose en las ratas con OAE, una mayor distribución e intensidad de la reacción. En conclusión, si bien no se observaron diferencias en la expresión de ICAM-1 y LFA-1 en S y G es probable que dichas CAM's activadas en el microambiente testicular jueguen algún papel en el desarrollo de la lesión.

- 170. Polimorfismo de FSH hipofisaria en distintos estadios del desarrollo sexual en la rata macho.** 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; Cátedra de Endocrinología, Fac. Cs. Exactas, UNLP, La Plata.*

FSH existe en múltiples isoformas, de acuerdo a la estructura de los oligosacáridos unidos al polipéptido. Hemos descripto que en la rata macho prepúber, la distribución y bioactividad de las mismas está influenciada por el entorno androgénico. En este trabajo se estudió la inmunidad (I) y bioactividad (B) de las isoformas de FSH hipofisaria en distintos estadios del desarrollo sexual en la rata macho. A partir de citosoles de hipófisis de ratas de 10, 33 y 75 días de edad, se aislaron tres grupos de isoformas utilizando cromatografía en concanavalina A: NR (no retenidas, estructuras triantenarias), DR (débilmente retenidas, biantenarias), FR (fueramente retenidas, alta manosa e híbridos). A los 10 días de edad el perfil de isoformas de FSH-I (%) fue: NR=4±0,4, DR=31±3 y FR=65±6; a los 33 días de edad: NR=9±1, DR=43±5 y FR=48±5; mientras que a los 75 días de edad: NR=17±3, DR=48±5 y FR=35±4. La relación B/I de las isoformas NR aumentó significativamente en ratas de 75 días (10 días= 0,28±0,02 vs. 75 días= 0,48±0,04; p<0,05), mientras que en DR y FR no variaron. En resumen, durante el desarrollo sexual en la rata macho, aumentan la proporción y bioactividad de las isoformas con cadenas

de oligosacáridos complejas, y disminuye la proporción de isoformas con estructuras carbohidratadas más inmaduras.

**171. Niveles de serotonina en testículo de Hamster dorado** . Mónica Frungieri; Silvia Gonzalez-Calvar; Livia Lustig; M. Rubio; RS Calandra.

*Instituto de Biología y Medicina Experimental; Fac. Medicina, UBA; ININFA-CONICET; Fac. Cs. Exactas, UNLP.*

En el presente trabajo se midieron por HPLC, las variaciones ontogénicas y la influencia del fotoperíodo en el nivel tisular y capsular de 5-HT y su metabolito el ácido 5-OH-indolacético (5HIAA). Paralelamente se evaluó, por tinción con azul de toluidina y Alcian blue, la localización histoquímica de mastocitos testiculares, y su cuantificación. En el estudio ontogénico, la concentración serotoninérgica (5HT+5HIAA: pmol/g.tej.) alcanza sus valores máximos durante la pre-pubertad y adultez (Tejido: 23d: 93,7±23,4; 36d: 305,5±34,1; 46d: 179,8±11,6; 60d: 293,6±29,7; 90d: 788,8±52,0 ;p<0,05) (Cápsula: 23d: 347,7 ±91,8; 36d: 814,2±78,7; 46d: 376,4±51,3; 60d: 991,5±74,0; 90d: 1078,6±86,5; p<0,05). Por otro lado, la exposición de hamsters adultos a fotoperíodos cortos (FC) (6h L:18hO) 14 semanas, no afectó los niveles serotoninérgicos capsulares (Control: 1078,6±86,5; FC: 1011,8±57,1) y disminuyó marcadamente los niveles intratissueulares (Control: 788,8±52,0; FC: 110,8±11,6; p<0,05). Los mastocitos presentaron una localización exclusivamente subalbugínea, y una variación en su número según la etapa del desarrollo y el fotoperíodo. Los presentes resultados muestran modificaciones en los niveles serotoninérgicos en relación con la edad y la información fótica, reflejando una regulación en la biosíntesis endógena, inervación local o circulación general.

**172. Clonado, expresión y actividad biológica de la proteína epididimaria DE**. Ellerman D., \*Werbajh S., Cohen D., Dematteis A., Cuasnic P.

*Instituto de Biología y Medicina Experimental..\*Lab. de Fisiología y Biología Molecular. FCEyN, UBA, Buenos Aires.*

La glicoproteína epididimaria de rata DE (37KD) se localiza en la membrana plasmática del espermatozoide y participa en el proceso de fusión de las gametas a través de sitios complementarios en el ovocito. Con el fin de analizar la relación entre la estructura de esta proteína y su función, llevamos a cabo el clonado y expresión de DE en bacterias. Para ello se realizó un "screening" de una biblioteca de cDNA de epidídimo de rata (en λ gt11) con el anticuerpo polyclonal específico anti-DE, obteniéndose 4 clones positivos, uno de los cuales fue secuenciado y presentó 100% de homología con la secuencia correspondiente a DE. El cDNA fue luego subclonado en fase en el vector pMAL p2 y expresado en células *E. coli* BL21. La proteína expresada, fusionada a la "maltosa binding proteína" (MBP), fue purificada y utilizada en ensayos de fusión espermatozoide-ovocito *in vitro*. Los resultados indicaron que mientras la proteína recombinante (rec DE), al igual que DE nativa, produjo una disminución significativa en el porcentaje de ovocitos fertilizados (rec DE: 2%, DE nativa 0%, p<0,001 vs. control), MBP no presentó efectos sobre dicha interacción (74% vs 83% control sin proteína). Posteriores experimentos de inmunofluorescencia indirecta confirmaron la unión de rec DE a la superficie del ovocito sin zona pelúcida. Estos resultados

indicarían que la participación de DE en el proceso de fusión ocurriría a través de la región peptídica de la molécula, constituyendo el primer paso en la identificación del dominio activo de esta proteína.

**173. Actividad funcional de espermatozoides electroeyaculados y epididimarios de Chinchilla laniger** . MF Ponzio, VA Aires, R Carrascosa, AA Ponce, M Fiol de Cuneo, RD Ruiz, JL Lacuara.

*Instituto de Fisiología, Facultad de Cs. Médicas, UNC, Córdoba.*

Un paso esencial en la aplicación de técnicas de fertilización asistida es la obtención de espermatozoides viables. Para evaluar la actividad funcional espermática en animales pequeños se han empleado gametas epididimarias, electroeyaculadas u obtenidas por vagina artificial. Chinchilla laniger es una especie en peligro de extinción en su hábitat natural y ha adquirido un relevante interés económico en criaderos. En el presente trabajo se estudiaron y compararon diversos parámetros que reflejan la actividad funcional espermática (motilidad, M; vitalidad, V; respuesta a la prueba de resistencia osmótica, PRO y reacción acrosomal espontánea, RA), en espermatozoides recién obtenidos de epidídimo caudal (A) o por electroeyaculación (B) recolectados en medio de Tyrode. Los resultados fueron (%) (A vs. B respectivamente): M: 95.0 ± 1.5, n=9 vs. 94.8 ± 1.4, n=14; V: 92.6 ± 2.4, n=9 vs. 91.4 ± 1.6, n=13; PRO: 78.5 ± 4.0, n=9 vs. 68.9 ± 3.2, n=13; RA: 12.4 ± 3.7, n=8 vs. 5.8 ± 2.1, n=6. No se detectaron diferencias significativas entre A y B, en ninguno de los parámetros mencionados. Los resultados expuestos evidencian la similitud funcional de las gametas de ambos orígenes; por otra parte, los valores detectados en cada parámetro, permiten asumir su posible utilización en técnicas de reproducción asistida. Trabajo subsidiado por CONICET y CONICOR e incluido en el PRIDRAH-CONICET.

**174. Modulación ejercida por señales fisiológicas o farmacológicas sobre la actividad funcional de espermatozoides bovinos criopreservados**. Vincenti LM, Fiol de Cuneo M, Ponce AA, Stutz G, Santillán ME, Martini C, Ruiz RD, Lacuara JL, Calvete JJ\* y Sanz L\*.

*Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas, UN.Cba., Argentina.\*Instituto de Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria, Hannover, Alemania.*

En el presente trabajo se propuso caracterizar la actividad funcional de espermatozoides bovinos criopreservados y determinar el posible efecto modulador ejercido por señales fisiológicas o farmacológicas. Los parámetros investigados fueron: motilidad (M), vitalidad (V), respuesta a la prueba de resistencia osmótica (PRO) y reacción acrosomal (RA). La M luego del descongelamiento fue 64.80±3.70 %, aumentó significativamente después de la filtración en columna de Sephadex G-25 (94.64±1.16 %, p<0,05) y decayó durante el período de capacitación (66.32±6.20 %); en este lapso (4h) también disminuyeron PRO y V (n=15 en todos los grupos). La adición de pentoxifilina (5 mM) y dibutilil-AMPc (1 mM) no modificó ninguno de los parámetros (n=7). La espermadesina plasmática bovina PDC-109 (1.5 mg/ml) y progesterona (P<sub>4</sub>, 10 μM), solas o combinadas, no provocaron cambios en M (n=8). PDC-109 produjo una disminución de la PRO (19.00±1.36 % y 9.00±1.85 %, a 0h y 4h, respectivamente, p<0,05), sugiriendo que la

espermadesina modifica el pasaje de agua a través de las membranas. La RA espontánea luego de 4h de capacitación fue de  $13.33 \pm 1.54\%$  y aumentó significativamente luego de la incubación durante los 20 min posteriores a ese período con PDC-109 ( $26.33 \pm 2.01\%$ ) o P<sub>4</sub> ( $20.43 \pm 4.26\%$ ) ( $p < 0.05$ ) indicando que estos agentes serían inductores o moduladores fisiológicos de este fenómeno. No obstante, no mostraron tener una acción sinérgica. Trabajo subsidiado por CONICET, CONICOR y SECyT -UNC e incluido en el PRIDRAH-CONICET.

- 175. ¿Puede la edad modificar los efectos de una dieta deficiente en ácidos grasos esenciales sobre la actividad funcional espermática?** Santillán ME, Ruiz RD, Fiol de Cuneo M, Vincenti L, Stutz G, Martini AC, Ponce AA y Lacuara JL.

*Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas, UNCba. Córdoba.*

El presente trabajo se realizó para evaluar los efectos de una dieta deficiente en ácidos grasos esenciales (DAGE), sobre la actividad funcional de espermatozoides epididimarios de ratones alimentados desde el destete (A) o desde la adultez (70 días de edad) (B), durante 2, 3 o 4 meses. Se determinó: peso corporal, PC; peso testicular, PT; y los siguientes parámetros espermáticos: concentración, C; motilidad, M; vitalidad, V; integridad de la membrana espermática mediante la prueba de resistencia osmótica (PRO) e índice de fertilización in vivo por acoplamiento natural, FIVO. PC (g) fue significativamente superior en A vs. su propio control (C<sub>1</sub>) y vs. B en todos los períodos ( $32.0 \pm 0.6$ ;  $29.5 \pm 0.3$  y  $30.0 \pm 0.6$ , respectivamente; n=6,  $p < 0.05$ , valores hallados a los 2 meses). En ninguno de los dos grupos se encontraron diferencias significativas en PT, M, o V, con respecto a sus controles, en todos los tiempos estudiados. En A, PRO y FIVO fueron siempre similares a C<sub>1</sub>. En B, PRO fue significativamente inferior a su control a los 2 meses ( $30.1 \pm 5.5\%$  vs.  $73.1 \pm 2.4\%$ , n=6 en todos los grupos,  $p < 0.05$ ), pero esta diferencia no se mantuvo en el tiempo. FIVO fue significativamente menor, en todos los períodos considerados (18 vs. 100%, 64 vs. 83% y 40 vs. 100% a 2, 3 y 4 meses, respectivamente). A partir de nuestros resultados se podría sugerir que los animales alimentados con dieta DAGE desde el destete, tienen mayor facilidad de adaptar su metabolismo con respecto a aquéllos privados de ácidos grasos esenciales desde la adultez y esto está reflejado en su capacidad reproductiva.

- 176. Oxido nítrico en el proceso de ovulación de la rata.** Alicia Faletti, Silvina Pérez Martínez y Martha F. Gimeno.

*CEFYBO - CONICET. Buenos Aires.*

El óxido nítrico (NO) producido a partir de L-arginina por la óxido nítrico sintasa (NOS) parece estar involucrado en el proceso de ovulación. El objetivo de este trabajo fue estudiar el sistema NO/NOS de ovario durante el período ovulatorio y su relación con la producción de prostaglandinas (PGs). Para ello se utilizaron ratas prepúberes tratadas con PMSG/hCG para inducir la ovulación. Se determinó la actividad de la NOS a las 0,4 y 10 hs post hCG por la técnica de conversión de <sup>14</sup>C-arginina en <sup>14</sup>C-citrulina. La actividad enzimática aumentó desde  $0.26 \pm 0.02$  a las 0 hs hasta  $0.43 \pm 0.03$  (pmol/min/ovario) a las 10 hs post hCG ( $p < 0.01$ ). Como las PGs ováricas incrementan durante la ovulación, se determinó la producción de PGs ováricas a partir de las 4 hs post hCG y se

observó que inhibidores de la NOS disminuyen la síntesis de PGs (control: 10.4 ng PGE/ovario; L-NAME: 4.8 ng PGE/ovario) mientras que donores de NO las aumentan (16.8 ng PGE/ovario,  $p < 0.01$ ). Con el objeto de caracterizar la isoenzima responsable de la producción del NO se determinó la actividad enzimática en presencia de L-NAME y/o EGTA. Se observó que a 0 y 4 hs post hCG el 87% de la actividad enzimática correspondía a la isoforma dependiente de Ca<sup>2+</sup>, en cambio a las 10 hs el 49% correspondía a la NOS dependiente de Ca<sup>2+</sup> y el 51% a la NOS independiente de Ca<sup>2+</sup>. Podemos concluir con estos resultados que durante el proceso de ovulación de la rata, se produce un aumento de producción de NO en ovario y que éste induce la síntesis de PGs necesarias para la ruptura folicular. Asimismo podemos sugerir que la isoenzima responsable de este aumento es la NOS inducible.

- 177. Factores implicados en la viscosidad del plasma seminal.** Gabriela Mendeluk, L. González Flecha, P. Castello, C. Brégni.

*Departamentos de Bioquímica Clínica, Química Biológica y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA, Buenos Aires.*

Nos proponemos estudiar el efecto de enzimas y agentes químicos en la viscosidad del plasma seminal. Se midió la viscosidad aparente ( $\eta_a$ ) por triplicado con un Vicosímetro Cono/Placa Brookfield, modelo DV-I, a 60 rpm y 25°C en aliquotas de pootes de plasmas seminales de consistencia normal y aumentada (formados por 18 y 16 muestras respectivamente), post-incubación durante 60min a 37°C con 100ul de buffer PBS(pH: 7.2), Tripsina, Ditiotreitol(DTT), EDTA,  $\alpha$ -amilasa y DNAsa(concentración final: 1mg/ml, 2.95mM, 12mM, 0.2% y 14.36 UK/ml respectivamente). En muestras individuales se dosaron proteínas(Bradford), DNA(Hoechst H323258) y se determinó el porcentaje de agua por diferencia de pesada luego de la filtración. La  $\eta_a$  fue  $3.6 \pm 0.1$  cp en el lote de consistencia normal y  $4.8 \pm 0.4$  cp en el de consistencia aumentada(incubación con PBS). En el primer grupo la  $\eta_a$  disminuyó 36% al agregar Tripsina( $p < 0.0001$ ). En el segundo grupo la  $\eta_a$  disminuyó 44% con Tripsina, 33% con DTT y 44% con  $\alpha$ -amilasa( $p < 0.00001$ ). El EDTA y la DNAsa no tuvieron efecto sobre la viscosidad. No se halló diferencia significativa en el contenido de proteínas(mg/ml), DNA(ug/ml) ni en el porcentaje de agua en los lotes en estudio (Datos expresados como media  $\pm$  ES; Consistencia normal:  $5.25 \pm 0.41$ (n:17),  $23.3 \pm 6.42$ (n:23),  $90.38 \pm 0.90$ (n:19) y Consistencia aumentada:  $5.03 \pm 0.60$ (n:14),  $28.41 \pm 3.87$ (n:60),  $90.33 \pm 0.69$ (n:18)). Se concluye que las proteínas están implicadas en la viscosidad del plasma seminal. La presencia de puentes disulfuro adquiere relevancia sobre la  $\eta_a$  en el lote de consistencia aumentada. La disminución de la  $\eta_a$  con el agregado de  $\alpha$ -amilasa fue un hallazgo que compromete a los hidratos de carbono en la etiología del fenómeno de Hiperviscosidad Seminal.

- 178. Cambios endocrinos reproductivos inducidos por Hexaclorobenceno (HCB) en ratas hembras.** P. Alvarez\*, L. Alvarez\*, A. Randi\*, G. Pirolí\*, A. Chamson\*, V. Lux\* y D.L. Kleiman\*.

*Dept. Bioq. Humana, Fac. de Medicina\*, U.B.A.; Instituto de Biología y Medicina Experimental\*, Buenos Aires.*

El HCB es un fungicida de múltiples efectos tóxicos. Se determinó su efecto endocrino reproductivo. Ratas hembras Wistar con ciclos regulares recibieron: (1) HCB por intubación gástrica durante 30 días, en dosis que inducen toxicidad hepática, porfiria

y alteraciones en el metabolismo tiroideo ( $1\text{g/lkg p.c.}$ ) $(n=7)$ , o (2) vehículo (C) $(n=7)$ . Las HCB mostraron extendidos vaginales con prolongación de los diestros (C:  $1,4 \pm 0,2\text{d.}$ , HCB:  $2,4 \pm 0,3\text{d.}$ ) y estros (C:  $1,3 \pm 0,1\text{d.}$ ; HCB:  $1,8 \pm 0,1\text{d.}$ )  $p<0,05$ , sin cambios en la duración de los proestos. La duración de los ciclos aumentó de C:  $4,22 \pm 0,65$  a HCB:  $6,87 \pm 0,44$ ;  $p<0,005$ . Los niveles séricos de estradiol (E), progesterona, LH y FSH evaluados en el estro no se alteraban. La prolactina (Prl) (ng/ml) (C:  $3,3 \pm 1,9$ ; HCB:  $1,5 \pm 1,3$ ;  $p<0,05$ ) y los receptores nucleares uterinos de E (fmol E/mg), medidos por unión del ligando, disminuyeron significativamente (C:  $89,0 \pm 17,5$ ; HCB:  $59,8 \pm 14,9$ ;  $p<0,05$ ). Histológicamente los ovarios HCB mostraron el estroma medular con grandes espacios lagunares, mayor cantidad de folículos en crecimiento atrésicos, ovocitos con núcleo picnótico e infiltrado inflamatorio. Conclusiones: El HCB produce cambios en la endocrinología reproductiva, caracterizados por alteraciones en los ciclos, en la histología ovárica, Prl circulante y receptores uterinos de estrógenos.

**179. Ensayo de activación de espermatozoides humanos con extracto de ovocitos de *Buffo arenarum*.** María Clara Carou, C.J. Quintans, R.S. Pasqualini.

*Halitus, Instituto Médico, Buenos Aires.*

Se investigó la utilidad de un extracto de ovocitos de sapo, *Buffo arenarum*, en un ensayo para producir descondensación de espermatozoides humanos. El objetivo es encontrar un método diagnóstico que permita evaluar la capacidad de los espermatozoides estudiados para formar pronúcleos cuando se los piensa utilizar para fertilización in vitro por inyección intracitoplasmática (ICSI). Los ovocitos se obtuvieron por descarga ovulatoria, inyectando gonadotrofina coriónica humana a sapos hembra. El extracto se logró lisando ovocitos centrifugándolos a 10.000g. La técnica consistió en agregar al extracto espermatozoides permeabilizados, e incubar durante tiempos variables. La reacción se detuvo con formaldehído, realizando frotis teñidos con Giemsa, donde se contó la proporción de espermatozoides descondensados. En muestras normales se logró la reacción en un rango del 80% al 98%. Se determinó la reproducibilidad del método obteniendo los siguientes Coeficientes de Variación % (CV): CV(entre 2 lecturas)=3,8 (n=8); CV(entre duplicados)=2,4 (n=6); CV(entre ensayos)=1,5 (n=4); CV(entre ensayos con extractos)=3,2 (n=2) CV(entre ≠ muestras)=7,1 (n=11). Resultó equivalente el uso de muestras frescas o criopreservadas: CV(entre duplicados)=0,1; CV(entre tratamiento)=0,3. Se concluye que el ensayo presenta una reproducibilidad adecuada para considerar su utilización para explorar el objetivo propuesto.

**180. Inhibina-B (Inh-B) en medios condicionados de cultivos primarios de células testiculares humanas prepúberes.** E. Berensztein, N. Saraco, A. Belgorosky, M. A. Rivarola.

*LabInvestigación, Hospital Garrahan, Buenos Aires.*

En el hombre la inh-B es producida por la célula de Sertoli y

sus niveles séricos descienden desde la infancia hasta la pubertad tardía. Por otro lado hemos descripto que la testosterona (T) basal en medios condicionados de cultivo primario de células testiculares humanas prepúberes era mayor entre 1-7 meses (M) que entre 12-36 M. El objetivo de este estudio fue analizar la secreción de inh-B en medios condicionados de cultivos primarios de células testiculares humanas prepúberes al 6º día de cultivo en 3 grupos (G) de edades: G1 (1-21 días, n=7), G2 (1-7M, n=9) y G3 (12-33M, n=4), bajo estimulación crónica con LH (n=4) y con FSH (n=7). La Inh-B fue medida por un enzimoinmunoensayo específico. La secreción basal de Inh-B fue significativamente más alta en el G1 ( $X \pm DS: 557 \pm 277$ ) que en el G2 y G3 ( $261 \pm 249$  y  $78,8 \pm 81,0 \text{ pg}/10^6\text{cel.}24\text{hs}$ , respectivamente  $p<0,05$ ). No se observaron cambios ni con LH ni con FSH. Mediante un análisis de regresión lineal se realizó una correlación entre la secreción de Inh-B y la edad, y entre la Inh-B y la T basal hallándose una correlación significativa negativa con la edad ( $p=0,035$ ) y positiva con la T basal ( $p=0,00001$ ). Este estudio muestra por primera vez in vitro que la Inh-B, como ocurre in vivo, disminuye con la edad en el testículo humano prepúber. La falta de respuesta a la LH y FSH observadas requieren ser confirmadas con mayores estudios. La Inh-B podría ser considerada como un posible marcador de células de Sertoli humanas inmaduras.

**181. Efecto de caltrin sobre el reconocimiento e interacción espermatozoide-ovocito en rata.** Carlos E. Coronel, Andrea Dematteis, María L. Novella y Rubén Ponce.

*Cátedras de Química Biológica, Facs. Cs. Médicas, CEFyN y Odontología. UNC, Córdoba.*

Caltrin (calcium transport inhibitor) es una proteína básica y pequeña de la secreción de vesícula seminal de mamíferos que se une a la región acrosomal de los espermatozoides (E) e inhibe la incorporación de calcio. Debido a ello se inhibe la liberación de hialuronidasa, enzima hidrolítica asociada con la reacción acrosomal. Caltrin posee homología estructural con inhibidores de tripsina tipo Kazal aislados de páncreas, hígado y secreción seminal. En este trabajo se estudió el efecto de caltrin sobre: a) la actividad de tripsina mediante método espectrofotométrico y de acrosina por ensayo en película de gelatina, y b) la interacción espermatozoide-ovocito usando ovocitos con zona pellúcida (ZP) en incubaciones in vitro. Tripsina fue drásticamente inhibida (~97%) con  $0.2 \mu\text{M}$  caltrin mientras que las preparaciones de E tratados con la proteína no manifestaron actividad proteolítica sobre la película de gelatina indicando inhibición de acrosina. La presencia de caltrin en el medio de incubación aumentó significativamente ( $p<0,001$ ) la población de ovocitos con E unidos a la ZP ( $98.4 \pm 0.43$ ) respecto al control ( $35.6 \pm 6.23$ ) y el número de E por ovocito ( $21.2 \pm 1.3$ ) respecto al control ( $1.2 \pm 0.12$ ). El mismo efecto se observó cuando los E tratados con caltrin fueron lavados para eliminar la proteína no unida. Experimentos similares realizados con ZP aislada arrojaron los mismos resultados. Los datos sugieren que caltrin inhibe la actividad de acrosina pero no bloquea la unión espermatozoide-ZP como se informó con otros inhibidores de proteasas; por lo contrario, facilita dicha interacción.

**Gastroenterología II**

- 182. Efecto de la hipoxia hipobárica crónica y la edad sobre el stress oxidativo.** Lidia E. Costa, Susana Llesuy, Gabriela Méndez, A. Boveris.

*Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Facultad de Medicina, y Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Buenos Aires.*

Nuestros estudios previos indican una menor generación de especies activas del oxígeno (AOS) en el hígado de ratas sometidas a hipoxia hipobárica crónica. Como el proceso de envejecimiento ha sido vinculado a la producción de AOS, se investigaron los efectos del envejecimiento en hipoxia sobre parámetros de stress oxidativo. Dos grupos de 6 ratas de 1 mes fueron sometidos a 58,7 kPa en una cámara de hipopresión durante 3-4(HY) y 14-15(HO) meses, respectivamente. Dos grupos similares se mantuvieron como controles a 101,3 kPa. Las ratas se sacrificaron por decapitación, se determinó el hematocrito, y se aislaron mitocondrias del hígado por centrifugación diferencial. En ellas se determinó: el contenido relativo de hidroperóxidos, estimado por la oxidación de la diclorofluoresceína (DCFH), la quimioluminiscencia estimulada por tertbutylhidroperóxido (BOOH-CL), que refleja el contenido de antioxidantes y la actividad de la superóxido dismutasa (SOD). La oxidación de DCFH (U/mg prot) resultó mayor en las membranas mitocondriales de HY:1.35±0.22 vs CY:0.74±0.09, p<0.05. La BOOH-CL (cpm/mg prot) fue menor en HO:24600±2100 y CO:22100±2400 que en las ratas jóvenes, tanto HY:34100±1900 como C:30850±2700, p<0.05. La SOD no cambió significativamente con la hipoxia ni con la edad. Los resultados sugieren que durante la adaptación a la hipoxia se producen cambios transitorios en el grado de stress oxidativo, y que con la edad habría un aumento en el contenido de antioxidantes, independientemente de la presión ambiental.

- 183. Estudio del polimorfismo genético de apolipoproteína E (apo E).** Adriana M. Almará, Elena G. Orellano, E.A. Ceccarelli.

*PROMUBIE - CONICET. Fac. de Cs. Bioq.y Farmacéuticas. U.N.R. - CIUNR, Rosario.*

Apo E es una proteína polimórfica con tres isoformas principales: E2, E3, y E4 que difieren entre sí por la presencia de residuos cisteína o arginina en las posiciones 112 y 158. La homocigosis para E2 se asocia con hiperlipoproteinemia tipo III mientras que la presencia del alelo E4 ha sido relacionada con un perfil lipídico aterogénico y un riesgo incrementado de padecer enfermedad coronaria y enfermedad de Alzheimer. Actualmente se dispone de información limitada sobre las variaciones alélicas de apo E en nuestro país. El objetivo de este trabajo fue estudiar el polimorfismo genético de apo E en la población general. Se preparó ADN genómico de individuos sanos normolipídémicos (25-48 años; n=32). Como control positivo se utilizó ADN de células C100 transfundidas con vectores de expresión de los genes de apo E2, E3 y E4 humanas. El ADN se amplificó por ASA-PCR con cuatro oligonucleótidos alelo específicos que detectan los intercambios Cys-Arg de las posiciones 112 y 158. Los productos

amplificados (145 y 277 bp) se identificaron por electroforesis en geles de agarosa. La distribución de genotipos encontrada fue: E2/E3= 9,4 %; E3/E3= 81,2 %; E4/E3= 9,4 %. Estos valores son similares a los observados para la población caucásica europea ( $p>0,1$ ). El estudio realizado puede tener aplicación para investigar la asociación entre genotipo apo E y las patologías antes mencionadas.

- 184. AINES selectivos cox 1 vs. cox 2 y úlceras gastrointestinales, en ratas.** O.M. Laudanno, J.A. Cesolari, J.M. Esnarriaga, P.Flaherty, J.A. Vada.

*Gastroenterología Experimental. Facultad de Ciencias Médicas, Rosario.*

Estudiar AINES selectivos COX1 vs. COX2 lesiones en el fundus, úlceras antrales y erosiones intestinales. Método: Ratas Wistar (n = 7), 200g, ayuno 36hs, se realizaron: I. Por sondaje orogástrico (OG): Fisiol., Indometacina (In), Piroxicam, Tenoxicam, Ketorolac, Diclofenac(D) y Meloxicam(M), dosis 60mg/kg, Ketoprofeno o, Ibuprofeno, Naproxeno(Na), Nimesulida(Ni) y Nabumetona (N); 500/ kg. II. Comida sólida (CS), pellets Cargill durante 1h, luego los mismos AINES, vía SC, e igual dosis. III. Misoprostol (Mi) 100 µg/kg OG, luego CS e In SC, 24 hs. Se sacrificaron las ratas, tórax-laparotomía, punción cardíaca y sangre para recuento de neutrófilos; extracción del estómago e intestino delgado (ID); se tabuló el % del área lesional macroscópica fúnica, ulcerosa antral y erosiva intestinal, por planimetría. Histología (H.E.). Resultados: I. Los AINES ácidos dieron área necrótica fúnica de 50-75% y 80-220 mm. erosiones en ID; los alcalinos 1-2% ( $p<0,01$ ) y sin lesiones en ID. II. Se definieron 5 AINES SC, previa CS, como selectivos COX2, que no dieron úlceras antrales ni erosiones intestinales y fueron: D, M, Na, Ni y N; en cambio los COX1 área ulcerosa antral de 10-40% ( $p<0,001$ ) y erosiones intestinales entre 110-395mm III. Mi impidió las úlceras antrales e intestinales inducidas por In. La histología dio infiltración leucocitaria en los antrós y todos los AINES dieron neutrofilia (5000-20000). Conclusiones: 1. El método CS AINES SC definió la selectividad COX 2 para: D, M, Nap, N i y N, ya que no inducen úlceras antrales ni intestinales como los COX1, 2. Los AINES ácidos son agresores gastrointestinales. 3. Los AINES COX1 inductores de úlceras antrales y erosiones intestinales son PGs endógenos dependientes.

- 185. Actividad de lipasa hepática en mujeres postmenopáusicas.** Gabriela Berg, Ana I. González, Regina Wikinski.

*Lab. Lipidos y Lipoproteínas, Dto. Bioq. Clínica, Fac. Farmacia y Bioquímica, UBA, Buenos Aires.*

Por su actividad de triglicérido-hidrolasa y fosfolipasa, la lipasa hepática (LH) podría condicionar la estructura y concentración plasmática de IDL, LDL y HDL<sub>2</sub>. En dosis farmacológicas, los estrógenos la inhiben y los andrógenos la estimulan. La LH es mayor en hombres que en mujeres; pero, su actividad en la post-

menopausia no es bien conocida. Nuestro objetivo es determinar la actividad de LH en mujeres post-menopásicas (MPM), en comparación con mujeres premenopásicas (MpreM) y correlacionarla con el perfil lipoproteico. Se adaptó y validó el método de Nilsson Ehle para medir LH en plasma post-heparínico. Se compararon MPM y MpreM ( $n = 67$  en cada grupo) y se encontró aumento en su actividad ( $14.7 \pm 0.6$  vs.  $9.0 \pm 0.6$  µmoles de ácidos grasos/ml.h,  $p < 0.001$ ). La actividad de LH correlacionó inversamente con colesterol - HDL<sub>2</sub> (col-HDL<sub>2</sub>) sólo en MPM, sin diferencia entre grupos en col-HDL total y sus subfracciones. A pesar de que col-IDL estaba aumentado en MPM, no hubo correlación con la actividad de LH. Col-LDL en las 134 mujeres mostró correlación positiva,  $p < 0.01$ , atribuible a la intervención de LH en el último paso del catabolismo VLDL → LDL. En MPM el aumento de la actividad de LH sería un factor aterogénico, por su correlación con la disminución en la subfracción protectora de HDL, la HDL<sub>2</sub> y el aumento de col-LDL.

- 186. Alteraciones morfológicas y funcionales inducidas por vaso-presina (VP) en duplas de hepatocitos aislados: II. Papel de la proteína cinasa C (PKC) y del Ca<sup>2+</sup> intracelular ([Ca<sup>2+</sup>]).**  
M.G. Roma, Vicki Stone, R. Shaw, R. Coleman.

*IFISE-Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. U.N.R. School of Biochemistry. The Birmingham University, England.*

Se estudió el papel de la activación de PKC y del aumento de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en las alteraciones morfológicas y funcionales provocadas por VP en duplas de hepatocitos aislados. Tanto el activador de PKC forbol di-butirato (PDB) como el ionóforo de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> A23187 indujeron un aumento dosis-dependiente del porcentaje de duplas presentando ampollas de membrana (Máximo:  $40.0 \pm 4.8\%$  y  $71.7 \pm 5.1\%$  a dosis de 1 y  $2.5 \mu\text{M}$ , respectivamente). Igual que VP, PDB ( $1 \mu\text{M}$ ) y A23187 ( $2.5 \mu\text{M}$ ) disminuyeron la cantidad de actina pericanalicular (Control:  $24.7 \pm 1.0$ ; PDB:  $16.5 \pm 1.7\%$ ; A23187:  $13.6 \pm 2.7\%$  del total de fluorescencia celular, \* $p < 0.05$ ), e inhibieron la capacidad de las duplas para acumular y retener en el canalículo la sal biliar fluorescente colil-lisil-fluoresceína (CLF) (Acumulación: Control:  $74.1 \pm 2.3\%$ , PDB:  $53.4 \pm 1.8\%$ ; A23187:  $34.8 \pm 3.4\%$ ; Retención: Control:  $70.3 \pm 2.9\%$ ; PDB:  $54.8 \pm 2.2\%$ ; A23187:  $40.1 \pm 3.5\%$ ; \* $p < 0.05$ , \* $p < 0.01$ ). Las alteraciones tanto morfológicas como funcionales inducidas por PDB y A23187 fueron completamente prevenidas por H-7, un inhibidor de PKC. Se concluye que las alteraciones morfológicas y funcionales inducidas por VP son esencialmente producto de la activación de PKC, y que el rol del [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> podría ser secundario a los requerimientos del catión para su actividad enzimática.

- 187. Diferencia asociada al sexo en la actividad glutatión S-transferasa hepática (GST) y en el contenido relativo de subunidades. Efecto de la testosterona (T).** M. Luquita, Viviana Catania, E. Sánchez Pozzi, Sandra Arriaga y A. Motino.

*IFISE (CONICET)-Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR, Rosario.*

GST, importante sistema enzimático de biotransformación de Fase II, está constituido por isoenzimas homo o heterodímeras de subunidades denominadas Ya, Yb<sub>1</sub>, Yb<sub>2</sub> e Yc, entre otras. En

este trabajo se evaluó la actividad GST hepática (método de Habig et al., sustrato: 1-cloro-2,4-dinitrobenceno, CDBN) y la composición en subunidades de GST en los siguientes grupos experimentales: hembras normales (HN), machos normales (MN), machos castrados 4 semanas previas al sacrificio (MC) y machos castrados (4 semanas) y después inyectados con T (MC+T, dosis: 70 mg de enantato de T/kg peso/semana, durante 4 semanas). Las actividades GST (nmoles de CDBN conjugado/min/mg proteína ± DS, n=4-5) fueron: HN=  $1209 \pm 124$  y MC=  $1458 \pm 131$  significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) de MN=  $1918 \pm 98$  y MC+T=  $2112 \pm 106$ . Además, al estudiar el contenido relativo de las distintas subunidades de GST por Western blot, observamos que HN muestra un menor contenido de Yb<sub>1</sub> e Yb<sub>2</sub> y un mayor contenido de Yc con respecto a MN y que MC tiene un menor contenido de Yb<sub>1</sub> e Yb<sub>2</sub> con respecto a MN. La administración de T a MC recupera el contenido relativo de Yb<sub>1</sub> e Yb<sub>2</sub> con respecto a MN. Conclusiones: 1- MN muestra mayor actividad GST que HN. 2- La castración asemeja la actividad GST a aquella observada en HN y luego la administración de T recupera el valor de actividad de MN. 3- Por lo tanto, T es responsable (al menos en parte) de la diferencia de actividad observada entre sexos, efecto que se ejerce a través de la modulación del contenido de determinadas subunidades.

- 188. Preservación de hepatocitos aislados en solución de la Universidad de Wisconsin (UW). IV-Evolución del contenido de ATP y Volumen Intracelular (Vi) durante la hipotermia y posterior reoxigenación.** María E. Mamprin, M. Klichuk, E.E. Guibert<sup>1</sup> y J.V. Rodríguez.

*Farmacología, <sup>1</sup>Biotología Molecular. Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. Rosario.*

Durante la preservación de suspensiones de hepatocitos de rata (HC) en UW los cambios debidos a la anoxia e hipotermia, se manifiestan durante la reoxigenación normotérmica y comprometen la viabilidad celular. En este trabajo, se preservaron HC (UW-96hs-4°C-N<sub>2</sub>). Diariamente se resuspendió una alícuota en Krebs-Henseleit (37°C-Carbógeno). En ambas condiciones se estudió el contenido de ATP (nmoles/10<sup>6</sup> cél.) y el V<sub>i</sub> µl <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O/10<sup>6</sup> cél.). En la reoxigenación de HC preservados (48hs) el ATP disminuye significativamente (Anova, \* $p < 0.05$ ) ( $t=0$  hs.:  $81.2 \pm 2.1$ ;  $t=48$  hs:  $70.8 \pm 1.7\%$ ; n=3), observándose también una reducción del V<sub>i</sub> ( $t=0$  hs:  $12.5 \pm 2.4$ ,  $t=48$  hs:  $8.2 \pm 1.6\%$ ; n=4). Sin embargo la reoxigenación de HC preservadas 72 y 96 hs mostró una abrupta disminución del ATP, sin cambios en el V<sub>i</sub> alcanzado para 48hs. Se concluye que una preservación mayor a 48hs, produce durante la reoxigenación de HC una incapacidad para mantener el ATP, fenómeno que comprometería de manera irreversible la regulación del V<sub>i</sub>.

- 189. Regulación de receptores de insulina en hepatocitos aislados de ratas hipoinsulinémicas crónicas hepatectomizadas.** Cristina Car-novale, J.A. Monti, C. Favre, Celina Scapini; María Cristina Carrillo.

*IFISE-CONICET, Fac. de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas.-UNR, Rosario.*

Se analizaron los cambios en la regulación de receptores de insulina (R) en la regeneración hepática posterior a la hepatectomía

parcial (65%) en ratas diabéticas. Se estudió la fijación de  $^{125}\text{I}$ -monoiodo-insulina (MI) y su degradación por hepatocitos aislados de ratas Controles (C, n=5), Diabéticas (D, n=5), Hepatectomizadas (HP, n=4) y Diabéticas-Hepatectomizadas (DHP, n=5). La hepatectomía a los animales diabéticos se les practicó 7 días luego de la administración i.v. de SZ (50 mg/kg). Las ratas hepatectomizadas se sacrificaron 48 h luego de la cirugía. Se aislaron los hepatocitos y se estudió la fijación específica de MI por análisis de Scatchard y de competición (0.1 a 1 ug/ml de insulina fría). Se analizó el efecto de cloroquina (Cq) (inhibidor del procesamiento intracelular) sobre la MI asociada a los hepatocitos. La concentración de receptores ( $R$ , pM) y las constantes de afinidad ( $K_a$ ,  $10^{12} \text{ M}^{-1}$ ) obtenidas del análisis de Scatchard fueron: C:  $R=0.88\pm 0.18$ ,  $K_a=3.78$ ; D:  $R=1.43\pm 0.01^*$ ,  $K_a=4.40$ ; HP:  $R=1.45\pm 0.01^*$ ,  $K_a=7.60^*$ ; DHP:  $R=4.30\pm 1.20^*$ ,  $K_a=23.90^*$ . Los porcentajes de radiactividad estimados de insulina IC fueron: C:  $19\pm 6\%$ ; D:  $129\pm 24\%^*$ ; HP:  $70\pm 15\%^*$ ; DHP:  $240\pm 35\%^*$ . ( $^* p<0.05$  respecto del C). Se concluye que el estado hipoinsulinémico y la hepatectomía aumentan el número y/o la afinidad de los receptores de insulina. La combinación de ambos tratamientos (DHP) produce una potenciación en el aumento, poniendo de manifiesto la importancia de la insulina como factor mitogénico en la regeneración hepática.

**190. Captación de [ $^3\text{H}$ ]-bilirrubina no conjugada (BNC) en hepatocitos aislados de hígado de rata en presencia de albúmina humana (AH).** María G. Mediavilla<sup>1,2</sup>, F. Cupelli<sup>2</sup>, L. Pascolo<sup>2</sup> y C. Tiribelli<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Biología Molecular.

Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. Rosario.  
<sup>2</sup>DBBCM. Universidad de Trieste. Trieste. Italia.

Estudiamos la captación de BNC en suspensiones de hepatocitos aislados de ratas Wistar hembra, en medio Hanks' ( $\text{pH}=7.40$ ) suplementado con ácido ascórbico (1mM), AH ( $100\mu\text{M}$ ) y [ $^3\text{H}$ ]-BNC (19 a  $59\mu\text{M}$ ). Conociendo que en estas condiciones experimentales la  $k_a$  para la unión BNC-AH es  $6.74\times 10^6 \text{ M}^{-1}$ , determinamos la entrada de BNC libre incubando (a  $37^\circ\text{C}$  y  $4^\circ\text{C}$ ) los hepatocitos con [ $^3\text{H}$ ]-BNC y deteniendo el proceso por centrifugación a distintos tiempos. El transporte específico de BNC libre ( $41.75\text{nM}$ ) en función del tiempo (0 a 60 min.) resulta lineal hasta 2 min., saturándose a partir de 30 min. ( $170.1\pm 5.22\text{ pmol/mg prot.}$ ). El análisis de las velocidades iniciales en función de la concentración de BNC libre (35 a  $208\text{nM}$ ) por Michaelis-Menten estableció valores de  $V_{\text{max}}=108\pm 8.2\text{ pmoles/(mg prot. min.)}$  y  $K_m=41.6\pm 11.6\text{nM}$ . Se establece la existencia de un transporte facilitado, saturable, para BNC en hepatocitos aislados en condiciones similares a las fisiológicas y se corroboran los resultados obtenidos anteriormente en vesículas de membrana de hígado de rata.

**191. Variación en la composición de las subunidades de glutation S-transferasa (GST) involucradas en la regulación por insulina.** J. Monti, C. Favre, Cristina Carnovale, Celina Scapini, María C. Carrillo.

IFISE-Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR, Rosario.

Las GST comprende tres familias de isoenzimas  $\alpha$ ,  $\mu$  y  $\pi$ . En trabajos previos demostramos que la insulina estimula la síntesis

global de GSTs hepáticas. El objetivo de este trabajo es identificar las subunidades que podrían estar implicadas en dicho aumento. Se utilizaron ratas machos Wistar adultos. El lóbulo mayor hepático fue extraído (control), se les inyectó insulina (I) en vena porta (2 UI/kg PC) retirándose los lóbulos restantes a diferentes tiempos. Para prevenir el efecto hipoglucemiante de I se administró glucosa (340 mg/kg PC). Se corroboró la actividad GST citosólica frente a clorodinitrobenzeno y las subunidades se evaluaron con anticuerpos específicos. Se obtuvieron los siguientes porcentajes de aumento comparados con el control:  $Y_1$ : 10 min.  $10.8\pm 3.2^*$ ; 15 min.  $23.7\pm 8.9^*$ ; 20 min.  $46.7\pm 5.3^*$ ; 30 min.  $47.0\pm 3.7^*$ .  $Y_2$ : 10 min.  $25.5\pm 3.2^*$ ; 15 min.  $33.3\pm 1.4^*$ ; 20 min.  $48.0\pm 9.3^*$ ; 30 min.  $56.0\pm 7.9^*$ . Diferencia significativa  $p<0.014$ . Las subunidades  $Y_1$  e  $Y_2$  permanecieron sin cambios significativos. **Conclusión:** La I produce un aumento significativo en las subunidades  $Y_1$  e  $Y_2$  (familia  $\mu$ ) de la GSH citosólica hepática, implicadas fundamentalmente en la detoxificación de mutágenos tales como el benzopireno.

**192. Evolución de la secreción biliar en estenosis coledociana incompleta (ECI).** Cecilia Larocca, G. Pisani, R. Trbojevich, Graciela Rodríguez, A. Rossi, E.A. Rodríguez Garay.

Instituto de Fisiología Experimental, CONICET - U.N.R., Rosario.

**Objetivos:** Analizar los cambios producidos a distintos tiempos después de producir ECI en la rata, a fin de obtener información sobre la evolución de la capacidad secretora hepática en estadios precoces de dicho modelo. **Métodos:** Se provocó ECI en 15 ratas Wistar machos, efectuando los estudios a las 24hs (L24, n=7) y entre los 7-12 días (L7-12, n=8). Otras 6 ratas sirvieron de testigos (S). Se recogió bilis 10min (basal) mediante un catéter ubicado distal a la estenosis o a una altura similar en S. Luego se infundió taurocolato de sodio (TC) a velocidades crecientes (1.03, 1.93 y  $2.51\text{ }\mu\text{mol/min/100 p.c.}$ ) para calcular su velocidad secretora max. (SRm). La bilis fue recogida cada 10 min durante 90min, extrayendo luego el hígado para estudios histológicos. En la bilis se determinaron flujo biliar (FB,  $\mu\text{l/min/g hig}$ ), excreción ácidos biliares (EAB,  $\text{nmol/min/g hig}$ ), actividad fosfatasa alcalina (AFA,  $\text{mU/l}$ ) y su excreción (EFA,  $\text{mU/min/g hig}$ ). **Resultados:** FB basal fue mayor en L24 ( $2.71\pm 0.19$ ) que en L7-12 ( $2.05\pm 0.12$ ) (\*) y en S tuvo valores intermedios ( $2.37\pm 0.15$ ). SRm para TC fue menor en L7-12 ( $211\pm 21$ ) que en S ( $360\pm 0.7$  (\*)), mientras que en L24 no tuvo diferencias significativas ( $262\pm 43$ ). AFA y EFA inducida por TC también fue menor en L7-12 que en los otros grupos durante la infusión (\*\*). Existió correlación positiva entre EFA y EAB en los 3 grupos: L24,  $-0.0618 + 0.0014 \cdot x$ ; L7-12,  $0.0350 + 0.0002 \cdot x$ ; S  $0.0310 + 0.0006 \cdot x$ , sugiriendo una menor remoción de FA por TC en L7-12. Los estudios histológicos indicaron un mayor volumen de hepatocitos ( $\mu\text{l}$ ) en L7-12 ( $2798\pm 76$ ) respecto a L24 ( $2499\pm 90$ ) (\*) y S ( $2302\pm 242$ ) (\*\*). El número de hepatocitos por unidad de volumen tisular estuvo además disminuido en L7-12. (\*)  $p<0.05$ , (\*\*)  $p<0.01$ . **Conclusiones:** Los resultados sugieren cambios adaptativos en la evolución de ECI protectores de la acción hepatotóxica de ácidos biliares.

**193. Glucuronización de fármacos en distintos modelos de hepatopatías.** Laura Bengoechea, Carolina Ghanem, Laura Marabotto, Cecilia Ghisolfi, J. Miño, Graciela Oviña y M. Rubio.

Cátedra de Fisiopatología y Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Buenos Aires.

La glucuronización de fármacos constituye la ruta metabólica más importante de detoxificación de fármacos. El objetivo de este estudio es comparar esta ruta metabólica en tres modelos experimentales de hepatopatías. Se utilizaron 4 grupos de ratas: G1=Colestáticas, sometidas a ligadura de colédoco, sacrificadas tras 7 días. G2 = Colestáticas intoxicadas con Paracetamol (P) a las que tras 7 días de colestasis se administró 1 g/kg peso vía I.P. G3=Intoxicadas con P: se administró P como al el grupo anterior. G4= Controles: sometidas a operación sham e inyectadas con vehículo. Se midió la actividad de UDP-Glucuroniltransferasa por método cinético utilizando como sustratos: cloranfenicol, morfina, lorazepam, paracetamol, diazepam y ac. salicílico. Los resultados se expresaron como nMol sustr.conj./mg prot/min. Cloranfenicol: G1 = 4.15±0.56; G2=6.27±0.9; G3=4.54±0.5; G4=6.32±0.1. Morfina: G1=4.69±1.2 G2 = 7.06±0.2; G3 = 2.87±0.2; G4=3.94±0.2. Ac. Salicílico, G1=4.63±1.9; G2=8.39±1.3; G3=5.31±0.9; G4=4.21±0.6. Lorazepam, G1=4.55±1.5; G2=8.11±0.7; G3= 5.66±1.44; G4=3.73±1.1. Diazepam, G1=4.94±1.2; G2=7.83±0.59; G3=4.52±0.38; G4=4.31±0.61. Paracetamol, G1=4.2±1.9; G2=6.54±0.51; G3=2.45±1.3; G4=3.91±1.2. El G2 mostró incrementos significativo de glucuronización para todos los sustratos ( $p<0.05$ ), excepto el cloranfenicol.

**194. Estado nutricional y timo.** Feliu M S®, Slobodianik N H.

Cátedra de Nutrición. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA\*, Buenos Aires.

Se analizan los efectos de la malnutrición proteica leve y moderada y la posterior realimentación sobre el timo de ratas en período de crecimiento activo. Ratas Wistar recibieron a partir del destete (21-23 días) dieta libre de proteínas hasta pérdida del 15% y 20% del peso inicial, cuadros de desnutrición leve y moderada, respectivamente (LP15, LP20); luego fueron realimentadas con dieta al 20% de caseína durante 9 días (R15, R20). Como controles se utilizaron ratas de igual edad que recibieron desde el destete dieta stock (C15, C20, CR). Al finalizar la experiencia, se les extrae el timo el cual fue pesado. Se determinó el contenido de DNA (mg/órgano), calculándose el N° de núcleos (millones) [ N° = DNA  $\times 10^3 / 6.2$  ] y el tamaño celular (Tc) [ Tc = Peso timo / N° ]. Los resultados fueron (X ± DE) :

Lote	DNA	Nº núcleos	Tc
LP15	2.1 ± 0.2*	344.1 ± 32.1*	0.35 ± 0.05
C15	4.5 ± 0.3	721.0 ± 54.2	0.34 ± 0.03
LP20	1.3 ± 0.3*	210.0 ± 56.6*	0.38 ± 0.03*
C20	9.2 ± 1.0	1484.2 ± 263.6	0.23 ± 0.02
R15	9.8 ± 2.0*	1578.0 ± 324.5*	0.18 ± 0.02
R20	8.0 ± 1.2*	1282.9 ± 185.9*	0.23 ± 0.05
CR	13.7 ± 1.2	2215.1 ± 199.5	0.18 ± 0.01

\*p<0.01 con respecto a su control

Los resultados sugieren que la malnutrición leve y moderada disminuyen la proliferación celular siendo dependiente del grado alcanzado; la administración de la dieta de recuperación no fue suficiente para revertir este efecto. La malnutrición moderada presenta un mayor tamaño celular que es revertido por la dieta de recuperación. # Financiado por UBA (FA-021); @ Becaria,UBA.

**195. Preservación hipotérmica de hígado en solución de la Universidad de Wisconsin (UW) y**

**Nitroprusiato de Sodio (NPNa). II-Respuesta vascular en la reperfusión.** Joaquín V.Rodríguez, G.Furno<sup>1</sup>, A.Scandizzi, L.Almada y E.E.Guibert<sup>2</sup>.

Farmacología, Estadística<sup>1</sup>, Biología Molecular<sup>2</sup>. Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. Rosario.

Se estudió el efecto que produce la adición de NPNa (500μM) a la sol. UW, sobre el lecho portal intrahepático de hígados de ratas Wistar, preservados durante 24, 48 y 72 hs (4°C) y luego reperfundidos en un sistema aislado con sol. Krebs-Henseleit/Álbumina bovina 2%. Se determinaron: la resistencia portal intrahepática ( $R_p$ ) (mmHg.min.g hig.ml<sup>-1</sup>) obtenida a un flujo de perfusión de 3.5 ml.min<sup>-1</sup>.g hig<sup>-1</sup> durante 1 hora, la liberación de LDH y K<sup>+</sup> al perfusato. Los resultados mostraron que a partir de 24 hs de hipotermia, la  $R_p$  se incrementa con el tiempo de preservación (24hs: 80%; 48hs: 104%; 72hs: 137%). El agregado de NPNa disminuye la  $R_p$  a las 24 y 48hs pero no revierte el daño a las 72hs ( $R_p$  controles: 1.26±0.24, n=6, vs. 48hs: 2.57±0.18, n=3,  $P<0.01$ ; 48hs NPNa: 1.86±0.05, n=3). Se concluye que la adición de NPNa a UW, mejora en la reperfusión la respuesta del lecho portal de hígados preservados hasta 48 horas en hipotermia.

**196. Trasplante en bazo de hepatocitos preservados, análisis de la distribución intrahepática.** Edgardo E. Guibert, S. Spinelli, A. Quintana<sup>1</sup>, A. Martínez<sup>1</sup> y J. Rodríguez<sup>2</sup>

Biotología Molecular, <sup>1</sup>Morfología y <sup>2</sup>Farmacología. Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario, Rosario.

El transplante hepatocelular (THC) puede ser eficaz en el tratamiento de ciertos desórdenes metabólicos y en fallas hepáticas agudas. La preservación hipotérmica de hepatocitos (HC) optimiza tiempos, costos y disponibilidad de células para el THC. En este trabajo se estudia la posibilidad de obtener, marcar, preservar, transplantar y seguir la evolución de HC inyectados en el bazo de ratas Wistar receptoras. HC son aislados enzimáticamente, marcados con Succinimidil Ester de Carboxifluoresceína, preservados 48hs. en solución de la Universidad de Wisconsin (UW), e inyectados (5x10<sup>7</sup>cel/ml) en el bazo. Entre 0 y 120hs, bazos y hígados son procesados con técnicas histológicas de rutina. En bazo, los HC fluorescentes se observan agrupados, sin contacto entre sí (0-3hs), en hileras (24-48hs) y constituyendo un anillo celular alrededor de la pulpa blanca (72-120hs). La migración al hígado de HC es inmediata, presentándose intraportales (0-3hs), agrupados (24-48hs) e integrados al parénquima (72-120hs). Con este sistema simple y no tóxico, que no presenta signos de rechazo, establecemos que la preservación (48hs-UW) no altera la disponibilidad de HC para el THC.

**197. Suplementación con hierro (Fe) y estado nutricional con respecto al Zinc (Zn) en gestantes.** María Luz de Portela, Adriana Weisstaub, Laura López, Mónica García, R. Guntin y C.R. Ortega Soler.-

Htal D. Paroissien.- Facultad de Farmacia y Bioq. UBA, Buenos Aires.

Se estudiaron 16 gestantes, clínicamente sanas, edad: 22.0±

7.5 años; peso:  $62.2 \pm 7.4$  Kg, atendidas prenatalmente en el Hospital D. Paroissien (La Matanza, Buenos Aires), desde  $17.2 \pm 2.8$  semanas de gestación (To). Un grupo (GFe) ( $n = 10$ ) recibió 100 mg/día de Fe (maltosato férreo) durante 9 semanas (Tf), comparando los resultados con el grupo sin tratamiento (GC) ( $n=6$ ). A To se realizó una encuesta de recordatorio de 24 hs, calculando la ingesta de Zn (IZn) en base a Tablas de Composición de Alimentos Inglesas y Alemanas. A To y Tf se determinó en sangre entera: Zn (Zn S), espectrofotometría de absorción atómica (EAA), y Hemoglobina (Hb), método de ciano-metahemoglobina; en orina basal: Zn (EAA) y Creatinina (Crea), método de Jaffé. Los promedios  $\pm$  DE fueron: a To: ( $n=16$ , sin diferencia significativa entre GC y GFe): Izn :  $4.6 \pm 1.8$  mg/día ( $2.8 \pm 0.8$  mg/1000 Kcal); Hb:  $11.8 \pm 1.1$  g/dL; Zn S :  $554 \pm 244$  ug/dL; Zn/Hb:  $47.1 \pm 20.5$  ug/g; Zn/Crea:  $0.56 \pm 0.42$ . Tf: GC:Hb:  $11.3 \pm 0.9$  g/dL; Zn S :  $574 \pm 80$  ug/dL; Zn/Hb:  $50.7 \pm 4.2$  ug/g; Zn/Crea:  $0.66 \pm 0.30$ . GFe: Hb:  $10.3 \pm 1.0$  g/dL ( $p < 0.05$  vs To); Zn S :  $478 \pm 118$  ug/dL; Zn/Hb:  $46.6 \pm 11.5$  ug/g; Zn/Crea:  $0.56 \pm 0.23$ . Estos resultados evidencian que, en este grupo, la suplementación con Fe no produjo modificación en los indicadores de estado nutricional con respecto al Zn, pese a la baja ingesta de dicho micronutriente. Financiado por UBA, subsidio B 086.

**198. Efecto del aluminio sobre la calbindin-D<sub>9k</sub> intestinal en ratas diabéticas.** D.Orihuela, Cristina Carnovale\*, María Cristina 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.

En la diabetes mellitus se ha observado una disminución de la absorción intestinal de calcio debida a bajos niveles séricos de  $1,25\alpha(OH)_2$ -vitamina-D que ocasionaría una disminución de calbindin-D<sub>9k</sub> (C<sub>9k</sub>) duodenal. Por otro lado, hemos demostrado que la administración de aluminio (AL) disminuye la absorción duodenal de calcio en ratas macho adultas. **Objetivo:** Se analizó la acción del AL sobre el contenido intestinal de C<sub>9k</sub> en ratas con diabetes experimental. **Metodología:** Ratones Wistar macho adultas fueron inyectadas i.v con 50 mg/kg de streptozotocina (STZ). Los animales se dividieron en lotes que recibieron respectivamente por vía s.c: salina normal, insulina NPH 10 UI/kg/día, calcitriol 0,08  $\mu$ g/kg/día y calcitriol 0,45  $\mu$ g/kg/día. El grupo control recibió vehículo de STZ. Cada grupo fue subdividido en dos subgrupos a los que se les administró, por vía de un catéter esofágico, 60 mg/kg/día de Cl<sub>3</sub>Al y agua destilada, respectivamente. Al cabo de una semana de tratamiento se midió el contenido de C<sub>9k</sub> intestinal en todos los animales por técnica de inmunoblotting. La banda correspondiente a la proteína C<sub>9k</sub> fue revelada por autorradiografía luego de la unión al <sup>45</sup>Ca y cuantificada por medio de un software para análisis de imagen. **Resultados:** Tabla 1: Densitometría de las autorradiografías, expresadas en porcentaje, considerando al control sin aluminio como el 100% :

Grupo experimental:	sin AL	AL(+)	% reducción
control	100	82	18
STZ	15	13	2
STZ + calcitriol 0,08 $\mu$ g	73	51	22
STZ + calcitriol 0,45 $\mu$ g	115	56	59
STZ + insulina	64	48	16

**Conclusión:** Se observa que a medida que aumenta el contenido de C<sub>9k</sub> duodenal, aumenta el porcentaje de reducción de la afinidad de la proteína por el calcio frente a una concentración elevada y constante de aluminio en la luz intestinal.

**199. Evolución del estado nutricional con respecto al hierro (Fe) en gestantes con y sin suplementación.** María Luz de Portela\*, Silvia H. Langini\*, Silvana Fleischman\*, Mónica García#, Laura B. López#, R. Guntin# y C.R. Ortega Soler#.

# Hospital D. Paroissien (La Matanza) y \*Cátedra de Nutrición, Ftad. de Farmacia y Bioquímica (UBA), Buenos Aires.

La administración de suplementos de Fe a las gestantes, aconsejada por OMS, es cuestionada. Por ello, se realizó el seguimiento de 56 gestantes, clínicamente sanas; edad:  $25.7 \pm 6.2$  años; peso, previo al embarazo:  $55.6 \pm 6.0$  Kg; ferritina sérica inferior a 50 ng/mL a edad gestacional inicial (To):  $18.5 \pm 4.0$  semanas. Se formaron 3 grupos: G1 y G2 recibieron Fe; G1: 100 mg/día (maltosato férreo); G2: 60 mg/día (fumarato ferroso); GC: control sin suplementar. A To y Tf (edad gestacional superior a semana 30) se determinó, en sangre entera: Hematócrito (Ht); Hemoglobina (Hb) (cianometahemoglobina); Protoporfirina Eritrocitaria (PE) (según Piomelli); en suero: ferritina (Enzimtest ferritina, Boehringer). Los valores ( $\bar{x} \pm DE$ ) fueron: To: G1, G2 y GC, respectivamente: Hb(g/dL):  $10.9 \pm 1.1$ ;  $12.6 \pm 1.2$ ;  $12.6 \pm 1.3$ ; PE(ug/dL glóbulos rojos):  $36 \pm 23$ ;  $25 \pm 12$ ;  $34 \pm 17$ ; FERR(ng/mL):  $29 \pm 26$ ;  $32 \pm 13$ ;  $23 \pm 11$ ; Tf: G1, G2 y GC, respectivamente: Hb(g/dL):  $10.4 \pm 1.0$ ;  $12.8 \pm 1.0$ ;  $11.5 \pm 1.4$ ; PE(ug/dL g.r.):  $27 \pm 19$ ;  $39 \pm 21$ ;  $47 \pm 23$ ; FERR(ng/mL):  $11 \pm 5$ ;  $17 \pm 8$ ;  $16 \pm 12$ . Los resultados evidenciaron que, entre To y Tf no hubo diferencias significativas en ningún grupo; la PE aumentó en GC y disminuyó en G1 y G2; por otra parte la FERR, indicativa de depósitos de Fe disminuyó a lo largo de la gestación, independientemente de la suplementación y de la fuente de Fe.

**200. Relación entre hipertrigliceridemia (HTG) y pancreatitis aguda (PA) en la rata.** R.Rosnik, L.Schreier, O.Ponzo, D.Rondina, P.Scacchi, M.Cresta, R.Wikinski.

Depto de Fisiología, Fac. de Medicina y Depto de Bioquímica Clínica, Lab. de Lipidos y Lipoproteínas, Fac. de Farmacia y Bioquímica - UBA, Buenos Aires.

La HTG puede conducir a la PA o ser un epifenómeno de esta. Con el fin de analizar esta asociación, nos proponemos evaluar un modelo en ratas de HTG provocada por dietas ricas en sacarosa y con PA instalada por ceruleína (cer) intraperitoneal, 45 mg/kg de peso. Se utilizaron 4 grupos de ratas: A) con dieta control, n=5 B) con dieta rica en sacarosa, n=5 C) con dieta con sacarosa y cer, n=7 D) con dieta control y cer, n=7. La dieta se administró durante 3 meses, y se sacrificaron los animales 6 h post inyección de cer o solución fisiológica en las ratas A y B. En el suero de las ratas se determinó: lipasa pancreática (LP), colesterol (col) y triglicéridos (TG); se aisló VLDL por ultracentrifugación y se determinó su composición química. LP en C y D fueron mayores que en A y B, media  $\pm$  ES, U/l:  $847 \pm 30$  y  $610 \pm 132$  vs. y  $17 \pm 1$  y  $24 \pm 6$ ,  $p < 0.05$ , respectivamente confirmando el modelo de pancreatitis. TG fue mayor en B que en A: mg/dl  $124 \pm 26$  vs.

65±7, p<0.05, respectivamente. En C y D los TG no difirieron de A. La composición química porcentual de VLDL demostró disminución de TG en C aumentando en consecuencia la proporción de col-VLDL con respecto a los demás grupos, p<0.05. La correlación en el conjunto de ratas, entre actividad de LP y TG-VLDL, fue negativa ( $y = -7.9x + 84.6$ ) p<0.05. La disminución de TG séricos, la disminución de TG-VLDL, y la correlación entre LP y TG-VLDL, indicarían hidrólisis de los TG-VLDL en el plasma de ratas HTG con PA.

201. **¿Es el factor de Von Willebrand un marcador de daño endotelial en pacientes con cirrosis?** L Albornoz, D Alvarez, A Gadano, JC Otaso, J Salvi, G León, P Sorroche, A Villamil, R Mastai.

*Sección de Hígado, Ecografía y Hemostasia, Hospital Italiano, Buenos Aires.*

Recientemente se ha sugerido que el factor de von Willebrand (FvW) puede ser un indicador de activación endotelial. Por otra parte, un aumento de producción de óxido nítrico (ON), vasodilatador sintetizado en el endotelio vascular, juega un papel

importante en las alteraciones hemodinámicas asociadas a la cirrosis. El presente estudio evaluó la relación entre los niveles plasmáticos del FvW y NOx (metabolitos finales del ON) en pacientes cirróticos (CH) con diferentes grados de severidad. Asimismo, se determinó su relación con la hemodinámica sistémica. Los resultados se compararon con un grupo de sujetos controles (CO). Los pacientes CH presentaron una circulación hiperdinámica con respecto a los CO, reflejada por una disminución significativa de la presión arterial media y resistencia vascular sistémica y por un aumento del gasto cardíaco. Los niveles de FvW:Ag y NOx fueron más elevados en pacientes CH que en CO (330±168 vs 92±20 %, p<0.05 y 28.7±10.9 vs 19.2±8.3 μmol/l, p<0.05, respectivamente). Este aumento fue progresivo y en relación con la severidad de la enfermedad. Se observó una correlación altamente significativa entre los niveles de FvW y NOx ( $r=0.61$ , p<0.001). No se observó correlación entre los parámetros hemodinámicos y los niveles de FvW y NOx. Nuestros resultados sugieren que la cirrosis hepática se acompaña de daño del endotelio vascular, manifestado por un aumento de FvW y ON. Asimismo, la determinación de FvW plasmático puede ser de utilidad como marcador de activación endotelial en pacientes con enfermedad crónica del hígado.

## Farmacología

- 202. Descripción de una fosfoproteína (FP) intermedia en la liberación de ácido araquidónico en tejido cardíaco regulable por isoproterenol.** Isabel Neuman, Constanza Lisdero, Carla Finkelstein, Paula Maloberti, Angela Solano, J.J. Poderoso, EJ Podestá.

Dpto. de Bioquímica y Lab. del Oxígeno. FMED UBA, Buenos Aires.

En los últimos años se han difundido los conceptos que postulan un diálogo cruzado entre diferentes sistemas de transducción de mensajes siendo la fosforilación de proteínas el nexo más importante. En este trabajo describimos la presencia y acción de una FP novel p43 en corazón originariamente aislada de adrenal. Análisis por SDS-PAGE, Western y Northern blot mostraron a p43 en corazón (C). Estudios de recombinación heteróloga *in vitro* de fracciones subcelulares sugieren la función de p43 en (C). Se perfundió el (C) de ratas adultas (sistema Langerdorff, 8 ml/min) con Krebs-Henseleit (KH) en 5% CO<sub>2</sub>/95%O<sub>2</sub>. La perfusión se realizó con isoproterenol (I, 10<sup>-7</sup>M) por 15 min o con inhibidores de PLA<sub>2</sub>, quinacrina y NDGA 15 min previos al I. Citosoles (800 ug de proteína) de (C) y de adrenal estimulados con I y ACTH activaron las mitocondrias y fracción particulada de adrenal produciendo 1463 y 3575 pg de progesterona (P4) por incubación respectivamente. Perfundiendo con KH, P4 fue no detectable (ND). Utilizando como fuente de PLA<sub>2</sub> las fracciones subcelulares cardíacas estimuladas con I se obtuvo 1575 pg de P4 vs 6975 pg utilizando las de adrenal. Quinacrina (100 μM) o NDGA (10 μM) dio valores de P4 ND (n=3), para quinacrina y ND (n=4) para NDGA. La hipótesis que surge de estos resultados es que p43 de (C) podría estimular la liberación de ácido araquidónico al igual que en tejidos esteroidogénicos.

- 203. Efectos de nicotina sobre la actividad funcional de espermatozoides epididimarios de ratón.** G Stutz, JM Busso, RD Ruiz, LM Vincenti, ME Santillán, AA Ponce, M Fiol de Cuneo, C Martini, JL Lacuara.

Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas, U.N.Cba. Córdoba.

Con el propósito de aportar datos relativos a los efectos de drogas de uso frecuente sobre la motilidad, vitalidad, resistencia al shock hiposmótico, reacción acrosomal, índice de fertilización *in vitro* y clivaje embrionario de espermatozoides epididimarios de ratón, se administró Nicotina (1.5 mg/kg/día, s.c.) (N) a machos adultos durante 35(A) ó 60 (B) días y a hembras desde el día 5 al 18 de gestación (las crías machos fueron sacrificadas en la adultez, D). Los grupos controles (C) recibieron solo vehículo. En A y B no se observaron diferencias significativas con respecto a C. En D, se detectó un descenso significativo del porcentaje de gametas móviles ( $69.9 \pm 1.9$ , n=21 vs  $78.8 \pm 2.3$  en C, n=8;  $p < 0.05$ ) con el concomitante incremento de las inmóviles. Con respecto al peso de los animales en el momento del sacrificio, fue significativamente inferior en aquéllos cuyas madres fueron inyectadas con N

( $24.36 \pm 0.5$ , n=21 vs  $26.6 \pm 0.7$  en C n=8,  $p < 0.05$ ). La tendencia de la droga es deprimir la motilidad cuando es administrada en el período prenatal y disminuir el peso corporal. Es conocido que N ejerce una variedad de efectos sobre el S.N.C.; entre ellos la inhibición del pico de testosterona en el día 18 de la gestación, podría explicar nuestros resultados.

- 204. Óxido nítrico en ratas hiperoxalúricas con bloqueo a diferentes niveles del sistema renina angiotensina.** Elena EMV de Cavanagh,<sup>†</sup> F Carrasquedo<sup>†</sup>; C Fraga<sup>†</sup>; F Inserrat<sup>†</sup>; L Férder<sup>†</sup>; JE Toblli<sup>†</sup>.

\*Cat. Físico-Química FF&B.UBA. † Fundación Bar Ilan. ‡ Laboratorio de Medicina Experimental Hospital Alemany, Buenos Aires.

El modelo de rata hiperoxalúrica (Hox) por etilenglicol (ETG), produce daño túbulointersticial, con participación del sistema renina-angiotensina (SRA) como fuera comunicado por nuestro laboratorio oportunamente (Medicina 56: 548; 1996). El objetivo de este estudio fue evaluar la producción de óxido nítrico (ON) en ratas Hox, y valorar la influencia del bloqueo del SRA a nivel de la enzima convertidora con enalapril (E) y del receptor AT1, con losartan (L). Se utilizaron machos Sprague Dawley (250-300 gr.). G1(n=6): Control; G2(n=6): Hox; G3(n=6): Hox+E, G4(n=6): E, G5(n=6): Hox+L, y G6(n=6): L. Durante 4 semanas se administraron ETG 1% y E 20 mg/l, en el agua de bebida, L 10mg/kg/día por sonda. El día 29 los animales fueron sacrificados. Se evaluó en el plasma la producción de ON por método espectrofotométrico basado en la reacción de Griess, previa reducción química de NO<sub>2</sub> y NO<sub>3</sub> (Nitrate Reductor World Precision Instruments, Inc. Sarasota, USA). Resultados expresados en μM (media ± SD): G1 =  $9.2 \pm 1.1$ ; G2 =  $9.1 \pm 1.1$ ; G3 =  $13 \pm 0.7$ ; G4 =  $10.7 \pm 1.3$ ; G5 =  $10.6 \pm 0.8$ ; G6 =  $10.6 \pm 2.9$ . ( $p < 0.05$  G3 vs. G1, G2, G5). Conclusiones: 1) El G3 tuvo aumento de ON con respecto a G1, G2 y G5. 2) Estos resultados sugieren que el efecto renoprotector de E en este modelo podría relacionarse con mayor producción de ON mediada por bradiquinina.

- 205. Mecanismo de Activación de Óxido Nítrico Sintasa Mediada por Receptores H1 en Glándula Submaxilar de Rata.** Graciela Stranieri; C. Pérez Leirós; F. Rosignoli; A. Genaro; L. Sterin-Borda; E. Borda.

Facultad de Odontología UBA.CEFYBO-CONICET. Buenos Aires.

La óxido nítrico sintasa (NOS) es la enzima responsable de la síntesis de óxido nítrico, regulador de múltiples funciones biológicas. El objetivo de este trabajo fue estudiar la actividad de NOS mediada por histamina (HIS) en glándula submaxilar de rata y la participación del Ca<sup>2+</sup> en este mecanismo como también de PKC. Se midió la actividad de NOS con HIS utilizando L-(U<sup>14</sup>C)-arginina como sustrato, en un medio con y sin Ca<sup>2+</sup>: Basal (pmol/

g. X ± ES, n(5): 450±36; HIS 10<sup>-7</sup>M: 664±53; HIS 10<sup>-5</sup>M: 404±40; HIS sin Ca<sup>2+</sup>: Basal: 532±58; HIS 10<sup>-7</sup>M: 742±66; HIS 10<sup>-5</sup>M: 375±33. No se observó el efecto estimulante cuando se inhibió la movilización de Ca<sup>2+</sup> por IP3 con cinarizina 10<sup>-6</sup>M: Basal: 424±38; HIS 10<sup>-7</sup>: 428±34; HIS 10<sup>-5</sup>M: 338±30. Se obtuvieron resultados similares al medir los niveles de GMPc. La HIS aumentó la actividad de PKC medida como traslocación de la enzima del citosol a la membrana. Basal (% de actividad en membrana, n=4): 55±5; HIS 10<sup>-5</sup>M: 86±7. Concluimos que la activación de NOS por HIS requiere de la movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular y que la activación simultánea de PKC podría participar en el efecto inhibitorio de NOS frente a altas concentraciones de HIS.

**206. Efectos del calcitriol sobre la presión arterial e insulínemia en ratas normotensas.** Jorge Toblli; P. Pagano; C. Nyberg; M. Angerosa.

*Laboratorio de Medicina Experimental. Hospital Alemán, Buenos Aires.*

El efecto del calcitriol (CTL) sobre el músculo liso vascular ha sido bien demostrado. No obstante las observaciones sobre la presión arterial (PA) son controvertidas. Por otra parte la relación entre hiperinsulinemia e hipertensión arterial es un hecho reconocido en la actualidad. El motivo de este estudio fue determinar la existencia de cambios en la PA y en los niveles de insulina (INS) sérica en ratas normotensas tratadas con CTL. Se utilizaron machos SD (250-300g). G1 control (n=12) y G2 experimental (n=12). Ambos con alimento estandar y agua común "ad libitum". Durante 15 días G2 recibió CTL 20ng/100g rata/día I.P. entre las 8.00-8.30hs. y G1 vehículo (propilenglicol + sol. salina isotónica). Se registró presión arterial sistólica (PAS) mediante "tail cuff" período basal y día 15. Se determinó en suero: calcio (Ca); fósforo; INS; glucosa; sodio; potasio; cloro; creatinina. La INS se determinó por RIA en fase sólida (Diagnostic Product Co. LA, CA). Los resultados se expresan en media ± sem. En el período basal: PAS (mmHg) G1= 120,5 ± 0,7; G2= 119,5 ± 0,9 (p=0,222). Día 15: PAS G1= 121,5 ± 0,5; G2= 134 ± 1,1 (p<0,001). Ca (mg/dL): G1= 9,6 ± 0,1; G2= 13,2 ± 0,4 (p<0,001). INS (μU/mL) G1= 14,7 ± 1,3; G2= 23,5 ± 2,1 (p<0,01). No hubo diferencias significativas en los otros parámetros evaluados. Conclusiones: 1) la PAS fue significativamente mayor en las ratas que recibieron CTL. 2) Los animales tratados con CTL mostraron niveles significativamente mayores de INS.

**207. Efecto paradojal de naltrexona sobre el óxido nítrico (NO) incrementado durante el estrés crónico.** E. S. Diaz, C. A. Mastronardi, A. Lomniczi, A. Faletti, V. Rettori y S.M. McCann

*CEFYBO-CONICET. Buenos Aires.*

En condiciones normales los opioides endógenos modulan negativamente la producción de NO. Por lo cual, se estudiaron los efectos del estrés sobre la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) en el Hipotálamo Medio Basal (HMB) de ratas Wistar macho adultas (3 meses). Nuestra hipótesis fue que en condiciones de estrés crónico, se alteran los niveles de β-endorfina, con lo cual se modifica el tono inhibitorio endógeno ejercido por los opioides sobre la NOS. Se midió la producción de NO por el método de <sup>14</sup>C-Citrulina en HMBs en 3 grupos experimentales: Grupo 1: En au-

sencia de estrés acústico 9 ± 0,2 pmoles NO/HMB/min. n=5. Grupo 2: En presencia de estrés acústico (67 db/10hs./día) desde el nacimiento, hasta 2 hs. antes del experimento 15,5 ± 0,3 n=15. Grupo 3: En presencia de estrés acústico hasta 3 días previo al experimento 13,3 ± 0,4 n=11. En grupos iguales a los anteriores se estudió el efecto de Naltrexona 10<sup>-6</sup>M (antagonista opioide) sobre la producción de NO. Se observó un aumento del 47% (p<0,0001) en la producción de NO en el grupo sin estrés, una inhibición del 25% (p<0,001) en ratas con estrés, y no se observó cambios en el grupo aislado por tres días. Estos resultados muestran que el estrés crónico aumenta la actividad de NOS hipotalámica y que en estas condiciones la Naltrexona tiene un efecto inhibitorio sobre la NOS, probablemente por una desensibilización de los receptores endorfinicos.

**208. Procesos inflamatorios agudos tratados con Meloxicam y Laserterapia.** V Campana, A Gavotto, M Moya, J Simes, N Edelstein, L Spitale, J Palma.

*Facultad de Ciencias Médicas. UNCba, Córdoba.*

Se evaluó en ratas la eficacia de Meloxicam y Láser blando sobre las variaciones en plasma de Fibrinógeno (FP) y Prostaglandina E2 (PGE2), y se estudió anatomía patológica (AP) de las articulaciones afectadas, en un foco inflamatorio agudo inducido. La flogosis se indujo por inyección intraarticular de cristales de hidroxiapatita en los miembros posteriores, divididas en grupos y tratadas con Meloxicam inyectable o Láser de Helio-Neón. Se dosó FP (mg/100ml) y PGE<sub>2</sub> (ug/ml) y se realizó AP. FP (352,8 ± 15,8) y PGE<sub>2</sub> (2,87 ± 0,2) incrementaron significativamente (p<0,001) en el grupo con hidroxiapatita comparado con el control: FP (221,64 ± 10,6) y PGE<sub>2</sub> (1,52 ± 0,1) y además existe diferencia significativa (p<0,001) tanto de FP (261,2 ± 7,3) como de PGE<sub>2</sub> (1,50 ± 5,10<sup>2</sup>) en grupo tratado con Meloxicam y de FP (221,6 ± 8,7) y de PGE<sub>2</sub> (1,63 ± 6,10<sup>2</sup>) con el tratado con Láser. La AP del tejido articular tanto de ratas con flogosis como en las tratadas demostró infiltrado mono y polimorfonuclear, nódulos granulomatosos, aumento de macrófagos y células gigantes (tipo cuerpo extraño). En la flogosis articular tratada con Meloxicam o Láser disminuyen FP y PGE<sub>2</sub>; ambas terapias utilizarían la misma vía inhibitoria Cox-2/Cox-1 y las semejantes lesiones AP de las tratadas y sin tratar podría explicarse por el corto período de aplicación de las terapias.

**209. Determinación de β<sub>2</sub> microglobulina en ratas tratadas con gentamicina.** Jorge Toblli; M. Papouchado; R. Stumpo; M. Fernandez; M. Sica; P. Pagano.

*Laboratorio de Medicina Experimental. Hospital Alemán & Cat. de Inmunología-IDEHU. FFyB. UBA-CONICET. Buenos Aires.*

La excreción de proteínas de bajo peso molecular se ha utilizado como marcador de daño tubular. Por otra parte es conocido el efecto tóxico de la gentamicina (GTA) a nivel del túbulos proximal. El objetivo de este estudio fue cuantificar β<sub>2</sub> microglobulina (β<sub>2</sub>M) en ratas tratadas con GTA. Se utilizaron machos SD (250-300g). G1 (n=5) control y G2 (n=5) GTA. Durante 7 días el G2 recibió GTA 80mg/kg/día s.c. Se recolectó orina de 24hs. postinyección los días 1; 3; 5; 7 y 9. La cuantificación de β<sub>2</sub>M fue realizada mediante un enzimoinmunoensayo de captura. Para ello, la β<sub>2</sub>M fue purificada a partir de orina mediante

pasos cromatográficos sucesivos. La captura de  $\beta_2$ M se realizó mediante anticuerpos generados en conejo y posteriormente purificados por cromatografía de afinidad. La  $\beta_2$ M capturada fue incubada con los mismos anticuerpos biotinilados y luego con avidina-peroxidasa. Resultados: (media  $\pm$  SEM, rango) ( $\mu$ g/día) G1 =  $10 \pm 3$ , 1-18; G2, día 1 =  $33 \pm 11$ , 4-66; día 3 =  $13 \pm 3$ , 3-22; día 5 =  $75 \pm 23$ , 23-156; día 7 =  $220 \pm 31$ , 120-270 y día 9 =  $99 \pm 48$ , 20-276. Conclusiones: 1) hubo diferencia significativa en la excreción de  $\beta_2$ M en los días 1, 5 y 7 del G2 con respecto a G1 ( $p=0.049$ ,  $0.025$  y  $0.001$ , respectivamente y 2) en el día 7 se observó la máxima excreción de  $\beta_2$ M en el G2.

**210. Generación de nitrato y nitrato en el metabolismo hepático de nitrofuranos.** Patricia H. Carrizo, Marta Dubin y A. O. M. Stoppani.

CIBIERG, CONICET, Facultad de Medicina, UBA, Buenos Aires.

Los nitrofuranos (NF) se emplean como antimicrobianos y antiparasitarios. Se sugieren varios mecanismos para su metabolismo y detoxificación: 1) la denitración y consecuente formación de especies reactivas del nitrógeno (NO; ONOO<sup>-</sup>); 2) el ciclo redox del grupo nitrógeno, con formación del nitroanión y 3) la reducción del NF a sus derivados nitroso, hidroxilamina y amina. Se determinó la formación de nitrato y nitrato (formas estables del NO<sup>+</sup>) en microsomas de hígado de rata incubados en presencia de nifurtimox (NFX), nitrofurantoina (NFA) o nitrofurazona (NFZ), con nitrato reductasa y reacción de Griess. Los niveles de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (nmol/nmol P450) en presencia de NFX 0,2 mM y NADPH 0,6 mM fueron (promedio  $\pm$  E.S.M.;  $n \geq 5$ ):  $31,0 \pm 1,3$  (NFX);  $31,9 \pm 1,7$  (NFA);  $32,4 \pm 3,6$  (NFZ);  $4,9 \pm 1,2$  (Control;  $p < 0,0001$ ). Dicha producción fue dependiente de la concentración de nitrofurano, de NADPH y de la proteína utilizada, indicando que el proceso estaría dirigido por una enzima microsomal que utiliza NADPH como cofactor. La generación de nitrato (nmol/nmol P450;  $n \geq 3$ ) fue:  $12,5 \pm 2,3$  (NFX);  $6,4 \pm 0,3$  (Control;  $p < 0,05$ ). En estas condiciones no se pudo hallar la amina correspondiente al NFX. Estos resultados sugieren que el metabolismo de los NF estaría dado por la denitración de los mismos, considerando que el rendimiento obtenido fue 15-20%, no pudiendo descartarse otros mecanismos. Las reacciones observadas permitirían relacionar la acción metabólica de los NF con la del NO.

**211. Evaluación de la excreción de proteínas urinarias de bajo peso molecular en ratas con lesión tubular por aminoglucósidos.** Jorge Toblli; R. Stumpo; M. Sica; M. Papouchado; A. Cardoso ; P. Pagano.

Laboratorio de Medicina Experimental, Hospital Alemán & Cat. de Inmunología-IDEHU. FFyB. U.B.A, Buenos Aires.

La incapacidad del túbulo proximal de reabsorber proteínas depende del grado de disfunción en que este se encuentre. Por otra parte es un hecho bien conocido que los aminoglucósidos producen grados variables de disfunción tubular proximal. El objetivo de este estudio fue determinar en forma cualitativa las excreciones de proteínas urinarias de bajo peso molecular luego de la lesión tubular por gentamicina (GTA). Se utilizaron machos SD (250-300g). G1 ( $n=6$ ) control y G2 ( $n=5$ ) GTA. Durante 7 días

entre las 8.00-8.30hs el G1 recibió solución fisiológica s.c. y G2 GTA 80mg/kg/día s.c. Se recolectó orina de 24hs. postinyección los días 1; 3; 5; 7 y 9. Las muestras se analizaron con gel de poliacrilamida y SDS. En cada calle de gel se sembró un volumen de orina desalinada previamente, correspondiente al 0,05% del volumen de orina de 24hs. Los geles se colorearon con técnica de plata. En la orina de los animales del G2 se observó: 1) una banda de tamaño correspondiente a  $\beta_2$ -microglobulina ( $\beta_2$ M), 11 kDa. en los días 5; 7 y 9 ( $n=3$ ), 7 y 9 ( $n=2$ ). 2) una banda correspondiente a lisozima (Lz) 16 kDa. en los días 7 y 9 ( $n=2$ ), 5; 7 y 9 ( $n=2$ ), 3; 5; 7 y 9 ( $n=1$ ). Ninguna de estas bandas fueron observadas en los animales del G1. Concluimos que tanto  $\beta_2$ M como Lz aparecen en tiempos similares en la orina luego de la lesión por GTA, al menos utilizando esta técnica de estudio.

**212. Efectos de la ingesta crónica de etanol sobre el metabolismo de lípidos de rata al final de la preñez.** <sup>1</sup>Eduardo Callegari, <sup>1</sup>G.A. Jahn y <sup>1</sup>M.S. Giménez.

Lab. de Química Biológica. Fac. Qca. Bqca. y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis.<sup>1</sup> LARLAC CRICYT-CONICET, San Luis.

El alcoholismo durante la preñez produce importantes cambios metabólicos y fisiológicos en la madre y severas alteraciones en la función reproductiva (fertilidad disminuida, parto temprano y alto riesgo de aborto). En este trabajo estudiamos los efectos de la administración crónica de etanol en el agua de bebida sobre el metabolismo de los lípidos en hígado (H) y glándula mamaria (GM) al final de la preñez. Ratas hembras Wistar: alcohólicas (AL) bebieron etanol al 16% desde el día 0 de preñez, controles (CO), agua sin etanol. Los animales se estudiaron al día 20, 21 y 22 de preñez. En el suero se determinaron los mg/dl de los diferentes lípidos y de alcohol por colorimetría. En H y GM se cuantificaron, en mg/g tejido, las fracciones de colesterol total (CT), libre (CL) y esterificado (CE) y triglicéridos (TG), previa extracción y separación en TLC. Los resultados indican término medio  $\pm$  error. Significación por test de Student para  $p < 0,05$ . En suero: colesterol al día 20,  $185,8 \pm 24,2$  (AL) vs  $111,6 \pm 11,6$  (CO); alcoholemia: al día 21,  $62,8 \pm 2,7$ , al día 22,  $97,2 \pm 14,1$ . Al día 22, AL vs CO, en H: a) CT:  $1,6 \pm 0,5$  vs  $3,4 \pm 0,4$ ; b) CE:  $0,8 \pm 0,09$  vs  $2,3 \pm 0,2$ ; c) CL:  $0,7 \pm 0,1$  vs  $1,2 \pm 0,1$ ; en GM: a) CT:  $8,2 \pm 0,7$  vs  $6,4 \pm 0,3$ ; b) CE:  $5,9 \pm 0,3$  vs  $2,8 \pm 0,3$ ; c) CL:  $2,5 \pm 0,3$  vs  $3,7 \pm 0,3$ ; d) TG:  $12,3 \pm 3,1$  vs  $26,8 \pm 4,4$ . En AL la ingesta calórica aumentó pero no se modificó el peso corporal en relación a CO. El etanol modifica el metabolismo de los lípidos en hígado y glándula mamaria.

**213. Diferencia ligada al sexo en la depuración de ácido paraaminohipúrico (PAH).** I-Análisis Farmacocinético. Jorgelina Cerruti (\*) y Adriana M. Torres.

Farmacología. Fac. de Ciencias. Bioquímicas. y Farmacéuticas. (\*) Farmacología. Fac. Ciencias Veterinarias. UNR. CONICET, Rosario.

Se ha descripto la existencia de diferencia ligada al sexo en la farmacocinética de algunas drogas. El objetivo de este trabajo fue determinar si tal diferencia se manifiesta en la farmacocinética de PAH. Se usaron ratas Wistar adultas, machos (M,  $n=4$ ) y hembras (H,  $n=4$ ). Se les administró una inyección única de PAH por vía endovenosa (0,3 mg/kg p.c.). Luego se tomaron muestras de san-

gre de arteria femoral a diferentes tiempos (0-15 min). El PAH se analizó por fotocolorimetría. Los datos farmacocinéticos se determinaron usando el programa PKCALC. Se demostró que la disposición de PAH en ratas se ajustó a un modelo bicompartimental, discriminado por el test AIC y  $r^2$ . Los resultados obtenidos fueron: Clearance sistémico (ml/min/100g):  $M = 3.57 \pm 0.34$ ,  $H = 2.21 \pm 0.23$ ,  $P < 0.05$ ; Tiempo medio de eliminación: ( $T_{1/2}K$ , min):  $M = 2.14 \pm 0.15$ ,  $H = 2.93 \pm 0.22$ ,  $P < 0.05$ ; Microconstantes de distribución (min $^{-1}$ ) [K12:  $M = 0.69 \pm 0.11$ ,  $H = 0.52 \pm 0.06$  y K21:  $M = 0.50 \pm 0.07$ ,  $H = 0.49 \pm 0.08$ ]; Constante de eliminación (K10, min $^{-1}$ ):  $M = 0.33 \pm 0.02$ ,  $H = 0.24 \pm 0.02$ ,  $P < 0.05$ ). Los volúmenes de distribución no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos sexos. Estos datos indicarían que las hembras presentan una menor depuración sistémica de PAH como consecuencia de una disminución en la velocidad de eliminación del mismo.

**214. Diferencia ligada al sexo en la depuración de ácido paraaminohipúrico (PAH). II-Análisis de la Función Renal.** Jorgelina Cerrutti (\*), C. G. Hofer, Georgina Montagna y Adriana M. Torres.

*Farmacología. Fac. de Cs. Bioq. y Farm. (\*) Farmacología. Fac. Cs. Veterinarias. UNR. CONICET, Rosario.*

Se ha demostrado que existe una diferencia ligada al sexo en la depuración sistémica de PAH en ratas. Resultó de interés estudiar la influencia del sexo sobre la depuración renal de PAH y sobre algunos índices de funcionalidad renal. Se usaron ratas Wistar adultas, Machos ( $M, n=6$ ) y Hembras ( $H, n=6$ ). Se prepararon para técnicas convencionales de clearance. Se determinaron: Velocidad de Filtración Glomerular [VFG, (ml/min/g):  $M = 1.18 \pm 0.12$ ,  $H = 0.53 \pm 0.07$ ,  $P < 0.05$ ], Clearance renal de PAH [Cl<sub>PAH</sub> (ml/min/g):  $M = 4.79 \pm 0.86$ ,  $H = 2.19 \pm 0.37$ ,  $P < 0.05$ ], Carga Filtrada y Secretada de PAH (ug/min/g) [CPA:  $M = 65 \pm 7$ ,  $H = 37 \pm 3$ ,  $P < 0.05$ ; CSPAH:  $M = 186 \pm 17$ ,  $H = 100 \pm 14$ ,  $P < 0.05$ ]. No se observaron diferencias significativas en las Excreciones Fraccionales de Sodio, Potasio y agua. Además, se estudió la captación de  $^3\text{H}$ -PAH en vesículas de membrana de ribete en cepillo usando la técnica de filtración rápida. Se obtuvieron los siguientes parámetros cinéticos: Vmax (nmol/15 sec/mg Prot):  $M = 214 \pm 16$ ,  $H = 229 \pm 8$  y Km (mM):  $M = 4.93 \pm 0.19$ ,  $H = 7.80 \pm 0.40$ ,  $P < 0.05$ . Podemos concluir que la diferencia ligada al sexo en la farmacocinética de PAH es consecuencia de una diferente depuración renal. Las hembras presentan menor velocidad de secreción y de filtración de PAH. Una menor afinidad del transportador luminal de las hembras contribuiría, en parte, a la disminución de la velocidad de secreción renal de PAH.

**215. Variabilidad farmacocinética de oxcarbazepina en pacientes epilépticos.** M.A. Bercellini, M.S. Vio-  
la, P. Grassini, P. Saidon, M.C. Rubio.

*Servicio de Neurología, Hospital Ramos Mejía y Cá-  
tedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y  
Bioquímica, UBA, Buenos Aires.*

La aplicación de estrategias farmacocinéticas para reconocer y controlar la variabilidad de la respuesta de los fármacos de nueva introducción en el mercado es una necesidad para el mayor control terapéutico. En este trabajo se analizó la cinética de la

oxcarbazepina (OXC), un nuevo anticonvulsivante. Se estudió una población de 30 pacientes con epilepsia sintomática y crítogénica, medicados con OXC por lo menos durante tres semanas con dosis variables ( $18.6 \pm 7.3$  mg/kg/día). Diez pacientes fueron comedidos con otros anticonvulsivantes y tres fueron refractarios a otras medicaciones. La edad y el peso promedio de los pacientes incluidos fueron  $32 \pm 14$  años y el peso  $73.3 \pm 21.2$  kg, respectivamente. Se extrajeron muestras plasmáticas de los pacientes antes de la primera toma de la mañana de OXC para la determinación por HPLC del metabolito monohidroxilado (MDH). Se observó una relación lineal entre la dosis de OXC y la concentración plasmática del MDH, con un coeficiente de correlación de 0.80 ( $p < 0.001$ ). El clearance del MDH calculado fue de  $4048 \pm 318$  ml/h, con un coeficiente de variación del 47 %. En dos pacientes comedidos con fenobarbital el clearance de MDH fue de 2777,7 y 10013,5 ml/h. Los pacientes comedidos con valproico se desviaron del clearance promedio de MDH ( $5842.5 \pm 620$  ml/h,  $n=4$ ). Estos resultados merecen el análisis de mayor número de pacientes medicados con OXC y otros anticonvulsivantes.

**216. Influencia de la testosterona sobre los efectos de fluoxetina y cocaína en el conducto deferente de la rata.** L. Busch; E.S. Borda.

*Cátedra de farmacología. FOUBA. Buenos Aires.*

La fluoxetina (F) y cocaína (C) provocan supersensibilidad del conducto deferente (CD) a la noradrenalina (NA), sin modificar la respuesta a la 5HT. Siendo el CD un órgano testosterona (To) dependiente, el objetivo del presente trabajo fue evaluar si los efectos de la F y C se modificaban en el animal castrado, y si las modificaciones se revertían con To. Se estudiaron los efectos de  $\text{F}10^{-5}\text{M}$  y  $\text{C}10^{-6}\text{M}$  sobre las contracciones provocadas con NA y 5HT en CD de ratas castradas (21 días), y ratas castradas que recibieron desde el día 14 al día 21, 0.4 mg/rata de To s.c. Se observó que los CD de los animales castrados tratados con F no presentaban supersensibilidad a la NA (NA sola  $10^{-6}\text{M}$ :  $206.7 \pm 78.8$ ; NA+F:  $266.7 \pm 55.3$   $n=6$ ) mientras que la castración no modificó el efecto de la C (NA sola  $10^{-6}\text{M}$ :  $160 \pm 97.4$ ; NA+C:  $472 \pm 100$   $n=6$ ). En los CD de los castrados tratados con To se manifestó la supersensibilidad a la NA tanto en los tratados con F como con C. Por otro lado, en los CD de los animales castrados la F provocó un disminución significativa de la respuesta a la 5HT (5HT sola  $10^{-6}\text{M}$ :  $325 \pm 78.5$  mg; 5HT+F:  $55 \pm 10$  mg  $n=6$ ) mientras que la C provocó un aumento significativo de dicha respuesta (5HT sola  $10^{-6}\text{M}$ :  $215 \pm 90$  mg; 5HT+C:  $495 \pm 87$  mg  $n=6$ ). Ambos efectos fueron revertidos con To. Se concluye que los efectos de la F sobre la contracción del CD provocada con NA y 5HT serían To dependientes, mientras que sólo los efectos de la C sobre la contracción provocada con 5HT, dependerían de la To.

**217. Una revisión crítica acerca de la anestesia y las porfirias.** Ana María Buzaleh\*, E. Vazquez\*, R. Enriquez de Salamanca\*\* y A. Battle\*.

\*CIPYP. CONICET UBA, Buenos Aires, Argentina. \*\*Hospital Doce de Octubre, Madrid, España.

Se ha realizado una actualización sobre el tema de la anestesia, con particular referencia a los anestésicos volátiles tales como Enflurano e Isoflurano seguida por una perspectiva de la relación entre el desencadenamiento de la crisis aguda en la Porfiria Aguda

Intermitente (PAI) durante la anestesia. La toxicidad hepática y renal de los anestésicos volátiles éteres fluorados se produce por biotransformación mediada por el citocromo P-450 a metabolitos tóxicos siendo el citocromo P-4502E1 la isoforma responsable del metabolismo de estos compuestos en humanos. La administración aguda y crónica de Enflurano e Isoflurano produjo alteraciones drásticas en el metabolismo del hemo y su regulación, confirmando las propiedades porfirinogénicas de estas drogas y reproduciendo los cambios bioquímicos característicos de la PAI. Se observó que por administración de una única dosis de 2 ml/kg de dichos anestésicos se producía una disminución significativa en la actividad de la Deaminasa sanguínea (VN: 0,288±0,100; VT: 0,144±0,050) y el consecuente incremento en la actividad de la enzima  $\delta$ -Aminolevúlico sintetasa (VN: 0,035±0,014; VT: 0,052±0,018). Diferencias entre la cepa y el sexo afectan la susceptibilidad de los animales a los cambios en el metabolismo del hemo producidos por la anestesia aguda. También se ha demostrado la asociación entre el alcohol y la anestesia. Los datos discutidos sugerían que el Enflurano y el Isoflurano, anestésicos volátiles químicamente relacionados, actuarían vía dos mecanismos diferentes, no obstante con un mismo resultado final: la desregulación del metabolismo del hemo.

**218. Activación diferencial de óxido nítrico sintasa (NOS) en glándulas salivales de rata.** Florencia Rosignoli, C Pérez Leirós, G Stranieri, L Sterin-Borda, ES Borda.

Cátedra de Farmacología. Fac. de Odontología, UBA. CEFYBO-CONICET. Buenos Aires.

La respuesta secretora y vasodilatadora en las glándulas salivales está mediada por receptores muscarínicos. Una de las señales acopladas a la activación de estos receptores es la producción de óxido nítrico por la NOS. El objetivo de este trabajo fue estudiar la actividad de esta enzima en glándulas submaxilar (SM) y sublingual (SL) de rata en condiciones basales y estimuladas vía receptores muscarínicos. Medimos actividad de NOS usando L-(U14C)-arginina como sustrato. Observamos una actividad basal de NOS dependiente de calcio menor en SM (pmol/g, X ± ES: 389 ± 26, n=10) que en SL (557 ± 41, n=6). Esta diferencia podría estar relacionada con la actividad de la PKC ya que la staurosporina aumentó la actividad de NOS en SM y no en SL. A su vez, al medir la actividad basal de PKC en SM detectamos una traslocación de la enzima del citosol a la membrana en SM (pmol/min./mg X ± ES: citosol 27.3 ± 3.1, membrana 26.2 ± 2.2 n=4) que no se observó en SL (citósol 31.1 ± 2.2; membrana 12.0 ± 2.9 n=4). En SM, el carbachol tuvo un efecto estimulante de NOS a  $5.10^{-7}$  M e inhibitorio a  $10^{-5}$  M, la misma concentración que estimula la actividad de PKC; en SL sólo se observó la estimulación de NOS. Una inhibición similar se observó con PMA en SM y no en SL. El efecto del carbachol fue parcialmente bloqueado por pirenzepina en SM. Los resultados indican diferencias en la actividad de NOS basal y estimulada en estas glándulas que podrían estar relacionadas a la activación de distintos subtipos de receptores y a un efecto regulador de PKC sobre la NOS.

**219. Efectos de GABA sobre la vasculatura del riñón aislado y perfundido de rata (RAPR) pretratado con bicuculina.** L.A. Monasterolo, L. Trumper, M.M. Elías.

Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Far-

macéuticas. UNR. CONICET. CIUNR. Buenos Aires.

En trabajos anteriores se demostró que GABA y el agonista GABA<sub>A</sub> baclofen provocan aumento concentración-dependiente de la presión de perfusión (PP) en RAPR. Con baclofen, se asocia una disminución de la velocidad de filtrado glomerular (VFG). El agonista GABA<sub>A</sub> muscimol no modifica PP en condiciones basales, ni en presencia de noradrenalina. El antagonista GABA<sub>A</sub> bicuculina (BIC) aumenta PP. El objetivo de este trabajo fue profundizar el estudio de la mediación de los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> en los efectos inducidos por GABA (GB) sobre la hemodinamia renal. Un grupo (BIC+GB, n=4) se perfundió con BIC 50μM desde el inicio del experimento. Luego de 2 períodos controles se evaluaron los efectos de GABA 0.05-1000 μM (BIC+GB<sub>0.05</sub>-BIC+GB<sub>1000</sub>) sobre la PP y VFG. Los resultados se expresaron como porcentaje de cambio relativo al control y se compararon con los del grupo GB (n=4) donde se evaluaron los efectos de GB<sub>0.05</sub>-GB<sub>1000</sub>. El aumento de PP fue mayor ( $p<0.05$ ) en BIC+GB (BIC+GB<sub>50</sub>= 19 ± 1.4 %) que en GB (GB<sub>50</sub>= 9 ± 2.5 %). La VFG sufrió una disminución concentración-dependiente en BIC+GB, cuyos valores difirieron de GB (GB<sub>50</sub>= -0.83 ± 4.04; BIC+GB<sub>50</sub>= -19.33 ± 3.46 %,  $p<0.05$ ). Estos resultados confirman que el aumento de PP estaría mediado por receptores GABA<sub>B</sub>, y sugieren que la activación de receptores GABA<sub>A</sub> contrarrestaría en parte esta vasoconstricción previniendo la caída en VFG.

**220. Acción antiespasmódica vesicular del Propinox Clorhidrato (P). Posible mecanismo de acción.** R. Baistrocchi, E Ortí, \*R de los Santos, \*G Digirolamo, \*M Martí, J Pico.

Laboratorios Roemmers.\*Pharmaconsult. Buenos Aires.

Con el fin de estudiar la acción de (P) se utilizaron vesículas aisladas humanas. Para la actividad antiespasmódica (n=27) frente a carbachol 1E-4M se les administró (P), Buscapina (B), Atropina (A) y Verapamil (L). Se efectuó la anatomía patológica (n=20) para determinar tipo de fibra y grosor del colgajo. Se determinó la unión a receptores: muscarínicos en membranas de cobayo: del fleon para M2/M3, de corazón para M2 y de glándula submaxilar para M3; y de antagonistas cárnicos: en el músculo esquelético para (L), en el músculo liso de fleon para nitrendipina (N) y en el cerebro de rata para diltiazem (D). Resultados y Conclusiones: 1.- El modelo parece adecuado para la investigación de fármacos activos a este nivel, si la muestra posee características tales como espesor (700 u aproximadamente, ausencia de fibrosis, etc). 2.- La DE50 para (P) es 1.34 E-6M; (B) 5.45 E-5 M; (A) 5.03 E-8 M; (L) 6.63 E-6 M. 3.- La unión de (P) a los receptores M2/M3 1.6 E-6M, a M2 1.2 E-6M, M3 1.5 E-6M, (N) 4.9 E-5M, (L) 5 E-6M y (D) 2.7 E-6M. 4.- El dual mecanismo de acción (anticolinérgico y bloqueante cárneo) sinergiza los efectos farmacodinámicos y minimizaría los tóxicos.

**221. Aspiración fetal de surfactante administrado por amniocentesis en guinea pig.** Ricardo Illia; C. Solanas; P. Oliveri; J. Toblli.

Laboratorio de Medicina Experimental. Hospital Alemán, Buenos Aires.

Recientemente se ha comunicado la posibilidad de prevenir el síndrome de dificultad respiratoria del prematuro mediante la inyección intra-amniótica de surfactante (S). El objetivo de este estudio es evaluar la distribución de S marcado con Tc99m e in-

yectado por amniocentesis en el saco amniótico (SA) de guinea pig (Gp) en el último tercio de la gestación. Se utilizaron Gp hembras de 58 días de gesta. Previa estimulación de los movimientos respiratorios con aminofilina IM (3 dosis de 4mg), se administró, bajo control ecográfico, en SA un volumen de 0.3cc conteniendo 0.75mg de fosfolípidos de S bovino marcado con Tc99m junto a 0.1cc de indigo carmín. Se constató actividad significativa en los dos pulmones de 7 crias, considerándose inyectadas fallidas otras siete en que no llegó el material al SA (n=4), o se realizó inyección intraplacentaria (n=3). La actividad registrada en estomagos (0.06 a 3%) de los siete casos positivos fue proporcional a la encontrada en los respectivos pulmones, mientras que en los otros órganos estudiados se encontraron valores porcentuales insignificantes. Todos los fetos no inyectados que se utilizaron como controles no registraron actividad radioisotópica. En base a estos resultados concluimos que existe además de la deglución un mecanismo aspirativo que produce una significativa llegada de S al espacio traqueo-bronquio-alveolar fetal.

**222. Efectos del losartan en ratas hiperoxaluricas.** Jorge Toblli; M. Angerosa; I. Stella; P. Pagano; C. Nyberg; L. Ferder; F. Inserra.

*Laboratorio de Medicina Experimental. Hospital Alemán & Fundación Bar Ilan, Buenos Aires.*

Estudios de nuestro laboratorio demostraron que la inhibición de la ECA protege del daño tubulointersticial (TI) causado por hiperoxaluria. El motivo de este estudio fue evaluar los efectos del losartan (L) relacionados a la protección renal en ratas con hiperoxaluria (Hox) por etilenglicol (ETG). Se utilizaron machos SD (250-300g), G1 control (n=6); G2 Hox. (n=6); G3 Hox.+L (n=6); G4 L (n=6). Durante cuatro semanas G1 con agua común, G2 y G3 con ETG 1% en el agua de beber. G3 y G4 con L 10mg/kg/día por sonda. Como marcador de daño tubular se determinó lisozima urinaria (LZ). Al finalizar el experimento todos los animales fueron sacrificados para su estudio patológico donde se evaluó lesión TI, 0=ausente; 1=mínima; 2=moderada; 3=severa y 4=muy severa. También % de  $\alpha$ -SMactina (%SMA). Resultados al final de la cuarta semana (media  $\pm$  sem): oxalato urinario ( $\mu$ g/g rat/día)\* G1= 1,4  $\pm$  0,04; G2= 12,8  $\pm$  0,82; G3= 11,1  $\pm$  1,31; G4= 1,5  $\pm$  0,08. LZ (ng/g rat/día)† G1= 72  $\pm$  3,2; G2= 108,5  $\pm$  4,1; G3= 100,1  $\pm$  6; G4= 74,9  $\pm$  3,8 Cl. Cr. (mL/min)‡ G1= 1,3  $\pm$  0,06; G2= 1,1  $\pm$  0,04; G3= 0,8  $\pm$  0,08; G4= 1,2  $\pm$  0,18. %SMA\* G1= 0,4  $\pm$  0,1; G2= 12,5  $\pm$  1,22; G3= 8  $\pm$  1,92; G4= 0,6  $\pm$  0,1. Lesiones TI \*, G1= 0,2  $\pm$  0,16; G2= 3  $\pm$  0,24; G3= 3  $\pm$  0,24; G4= 0,1  $\pm$  0,12. \*(p<0,01 G2 vs. G1, G4 y G3 vs. G1, G4). #(p<0,01 G1 vs. G2, G3). †(p<0,01 G3 vs. G1, G2, G4; y G1 vs. G2). Conclusiones: basados en estos resultados concluimos que L no mostró un efecto renoprotector en este modelo.

**223. Efectos de ibuprofeno y piroxicam sobre la actividad funcional de espermatozoides murinos.** AC Martini, G Stutz, M Fiol de Cuneo, RD Ruiz, L Vincenti, M Samillán, AA Ponce y JL Lacuara.

*Instituto de Fisiología. Facultad de Ciencias Médicas. UNCba, Córdoba.*

Con el fin de detectar posibles efectos de antiinflamatorios no esteroideos (AINE) en la actividad funcional espermática, estudiaron

mos la influencia de ibuprofeno (IBU) o piroxicam (PIR), administrados tanto *in vivo* como *in vitro*, sobre la motilidad, vitalidad, presencia de formas acodadas, respuesta al shock hiposmótico, integridad acrosomal e índice de fertilización *in vitro* (IFV) de espermatozoides epididimarios de ratón suspendidos en medio de Tyrode. Se evaluó también, el índice de fertilización *in vivo*. Para los ensayos *in vivo*, IBU (0.56mg/100g/día) o PIR (0.028mg/100g/día) fueron inyectados (i.p.) durante 60 días y los controles (C) recibieron vehículo (propilenglicol o dimetilsulfóxido). En los experimentos *in vitro* se adicionó al medio IBU o PIR ( $10^{-7}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-3}$  M) luego de 70 min. de incubación y durante 20 min. El índice de fertilización *in vivo* disminuyó significativamente con PIR (78%, n=18 en C vs 43%, n=14; p<0.05). Este efecto podría atribuirse a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas (PGs) ejercida por PIR, ya que se ha sugerido que las PGs pueden aumentar la migración espermática, debido a sus efectos en el músculo liso uterino y oviductal. Los experimentos *in vitro* mostraron diferencias significativas en el IFV con PIR  $10^{-3}$  M (76.5%, n=81 en C vs 59%, n=87; p<0.05) y en el número de espermatozoides con acrosoma intacto con IBU  $10^{-3}$  M (59,00  $\pm$  7,15 en C vs 38,58  $\pm$  3,49; p<0.05; n=8). La elevada concentración requerida para obtener estos efectos, permite postular una acción inespecífica de estos AINE.

**224. Suplementación con múltiples antioxidantes en humanos: efecto de la coenzima Q10.** Fernando Carrasquedo, S. B Lotito, E. M. V. de Cavanagh, C. G. Fraga.

*Fisicoquímica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA, Buenos Aires.*

Evidencia epidemiológica y bioquímica sugiere que una adecuada ingesta de antioxidantes puede ofrecer protección frente a las enfermedades asociadas con la edad. La mayor parte de los antioxidantes son obtenidos de los alimentos o como suplementos nutricionales. Muchos suplementos son diseñados sin considerar la interacción y efectos combinados de los antioxidantes. Aquí investigamos la farmacocinética, interacción y potencial actividad antioxidant de una mezcla de antioxidantes, especialmente relacionado con su contenido de coenzima Q10 (CoQ). A treinta voluntarios (25-46 años) se les administró diariamente una suplementación oral conteniendo 200 UI de vitamina E (VE), 250 mg de vitamina C (VC), 15 mg de  $\beta$ -caroteno (BC). Un subgrupo (n=14) recibió además 30 mg de CoQ/d. El contenido de VE, BC, ubiquinol-10 (QH) y VC se determinó por HPLC con detección electroquímica. Los productos de oxidación en plasma se evaluaron como hidroperóxidos y sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS). Las concentraciones plasmáticas de todos los parámetros estuvieron dentro de los valores normales. Los valores plasmáticos de VE, BC y VC se incrementaron en todos los sujetos. VE y VC alcanzaron un valor máximo en el día 10, en cambio BC aumentó a lo largo del estudio sin estabilizarse en un valor máximo. La ingesta de CoQ incrementó significativamente los niveles de QH pero no alteró la farmacocinética de VE, BC y VC. Un mes después de terminado el tratamiento las concentraciones de cada antioxidante retornaron a los valores basales. Se observó una disminución no significativa en los TBARS asociada con la ingesta de CoQ. A partir de los resultados obtenidos se discutirá: a) el efecto de la suplementación con múltiples antioxidantes; b) el posible efecto protector de la coenzima Q.

## Tumores I

- 225. Terapia génica en cáncer utilizando células tumorales expresando citoquinas.** S. Adris\*, D. Klein+, A. Bravol, M.A. Jasnis+, F. Ledda\*, Y. Chernajovsky#, O. Podhajcer\*.

\*IIB-Fundación Campomar, +Instituto de Oncología A. Roffo, IHosp.E.Perón #Kennedy Institute of Rheumatology, London, United Kingdom.

El uso de células tumorales modificadas por transducción de retrovirus recombinantes, surge como una alternativa terapéutica para producir citoquinas *in vivo* sin los efectos tóxicos derivados de su uso sistémico. Virus recombinantes conteniendo cDNAs codificantes para IL10 e IL12, se utilizaron para transducir la línea celular de colon CT26, con el objetivo de estimular la respuesta humorla y celular respectivamente. Estudios en ratones singeneicos Balb/C mostraron: a) entre un 100-50 % de inhibición del desarrollo del tumor primario al ser inyectados con 1-10.10<sup>5</sup> células CT26-IL10. Estudios realizados en ratones atípicos e inmunocompetentes depletados de linfocitos CD4+ y CD8+ demostraron la participación de las células T y no T en el rechazo tumoral. b) con dosis de 5.10<sup>5</sup>-1.10<sup>6</sup> células CT26-IL12 no hubo desarrollo tumoral, en tanto que 3.10<sup>6</sup>-5.10<sup>6</sup> desarrollaron nódulos palpables 9-15 días después de la inyección, los cuales regresaron completamente. Los controles inyectados con CT26 desarrollaron tumores en todas las dosis de células. En ambos casos los ratones que rechazaron el tumor primario fueron inmunes a un desafío con células parentales. Para estudiar el rol de Th1 y Th2 en la respuesta antitumoral, se determinaron los niveles específicos de los isotipos IgG2a e IgG1 que reconocen CT26: a) ratones que rechazaron CT26-IL10 mostraron, un incremento de 8-10 veces en los niveles de IgG1 b) los que rechazaron CT26-IL12 mostraron un incremento de 3-3,6 veces en los niveles de IgG2a. Conclusión: a) la respuesta inducida por IL10 está mediada por CD4+, CD8+ y por el subtipo Th2. b) la inducida por IL12 está mediada por el subtipo Th1 y posiblemente un proceso angiogénico.

- 226. Acortamiento telomérico irreversible en células tumorales mediante tratamiento con AZT.** DE Gomez y Ofelia Olivero.

Laboratorio de Oncología Molecular, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes y National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA.

Los telómeros, secuencias repetitivas de ADN ubicadas en el extremo del cromosoma, se acortan entre 30 y 50 pares de bases en cada mitosis. Esto dictamina la duración de la vida de las células individuales. Las células germinales, tumorales y las troncales solucionan el acortamiento de sus telómeros mediante la telomerasa, una polimerasa particular que contiene un templado de ARN. Previamente, hemos demostrado mediante inmunohistoquímica y digestión diferencial que la AZT (3'-azido-2',3'-dideoximadina) se incorpora preferencialmente en el ADN telomérico. Para determinar si la incorporación de AZT al telómero es un fenómeno mediado por la telomerasa, se trataron

células tumorales humanas (HeLa) con 800 μM de AZT. Se extrajo el ADN de las células tratadas en cultivo hasta 20 pasajes consecutivos y se lo digirió con enzimas de restricción. El subsecuente Southern blot reveló, mediante el uso de una sonda telomérica biotinilada, un progresivo acortamiento de las repeticiones teloméricas. Los telómeros acortados no aumentaron su longitud luego de cultivarlas sin AZT por 25 pasajes adicionales. El presente trabajo demuestra que el acortamiento telomérico provocado por el tratamiento con AZT es irreversible. Si bien el AZT interfería con la actividad de telomerasa, no se detectaron evidencias morfológicas o bioquímicas de senescencia. Esto puede deberse a que el número de pasajes tratados no fueron suficientes para desencadenar la muerte celular, o a que el acortamiento telomérico induce un mecanismo compensatorio de preservación o a la aparición de resistencia al AZT.

- 227. Propiedades antitumorales de la lovastatina en un modelo experimental de carcinoma mamario.** DF Alonso, HG Farina, G Skilton, MR Gabri, Mariana De Lorenzo, DE Gomez.

Laboratorio de Oncología Molecular, Departamento de Ciencia y Tecnología, UNQ, Quilmes .

Las células cancerosas sintetizan grandes cantidades de colesterol a partir de mevalonato, un precursor de moléculas isoprenoídes que se unen a proteínas esenciales para la señalización celular y la proliferación. La lovastatina (LST) es un inhibidor competitivo de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa, enzima limitante en la ruta biosintética del colesterol que cataliza la síntesis de mevalonato. Se estudió el efecto de LST sobre el crecimiento de colonias *in vitro*, adhesión y migración en presencia de suero de células F3II de carcinoma mamario murino. En hembras Balb/c portadoras de tumores F3II subcutáneos se investigó el efecto de LST (10 mg/kg/día, i.p.) sobre la progresión de la enfermedad metastásica. LST arrojó una IC50 de 4.5 μM luego de 7 días de exposición continua de células F3II en crecimiento. En monocapas quiescentes, dosis de hasta 10 μM durante 24 horas no produjeron citotoxicidad. En estas condiciones, LST redujo la adhesión al sustrato y bloqueó la migración celular (Control: 438 ± 15 vs LST: 248 ± 20 células/mm<sup>2</sup>; p<0.001). El agregado de mevalonato (100-200 μM), pero no de famesilo, revirtió ambos efectos de la droga. *In vivo*, LST retrasó la toma tumoral y redujo la incidencia de nódulos metastásicos en pulmón (Control: Md 4, rango 1 a 11 vs LST: Md 0, rango 0 a 3; p<0.05). Los datos sugieren que la droga podría interferir procesos biológicos indispensables para el crecimiento y diseminación de células tumorales mamarias.

- 228. Receptores con actividad de tirosina-quinasa tipo I en adenocarcinomas mamarios murinos.** ME Balañá, M Goin, M Salatino, C Lanari, EH Charreau, P Elizalde.

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires.

Se estudió la expresión de la familia de receptores con activi-

dad de tirosina-quinasa tipo I (p185erbB2, p180erbB3 y p185erbB4) en adenocarcinomas mamarios inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA) en Balb/c. Se detectó la presencia, mediante ensayos de western blot, de los tres tipos de receptores en tumores lobulillares hormono-independientes (HI) y tumores ductales hormono-dependientes (HD) y HI. El MPA indujo un aumento significativo en la expresión de p185erbB2 y p180erbB3 en las líneas HD. Los niveles de p18 erbB4 no fueron regulados por MPA. Los niveles de p185erbB2 en los tumores HI lobulillares son similares a los encontrados en los tumores HD tratados con MPA. El agregado de oligodesoxinucleótidos antisense (OA) al ARNm de erbB2 a un cultivo primario de células epiteliales de un tumor HI lobulillar produce una inhibición significativa ( $p<0.001$ ) de la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina respecto de los controles creciendo en 5% de suero fetal bovino. El tratamiento con oligodesoxinucleótidos sense (OS) no produce efecto sobre la proliferación (cpm/incubación, control: 5799±511, OA: 2329±262, OS: 4620±869). Postulamos que la proliferación mediada por MPA estaría asociado a un aumento en la expresión de p185erbB2 y p180erbB3. En los tumores lobulillares, en los que previamente demostramos la ausencia de ligando (heregulina), la activación constitutiva de p185erbB2 le otorgaría una ventaja proliferativa.

- 229. Inmunomodulación de la apoptosis por citoquinas en células leucémicas.** Elosi Caldas Lopes, C. Waldner, C. Mongini, A. Escalada, M.J. Gravisaco, M. Sánchez Lockhart, E. Alvarez & S. Hajos.

IDEHU (CONICET-UBA), Buenos Aires.

El uso de agentes inmunomoduladores como la Ciclosporina A (CsA) en el tratamiento de leucemias provocaría la inducción de mecanismos apoptóticos en células leucémicas dependientes de factores de crecimiento. Los objetivos de este trabajo fueron estudiar la inducción de la apoptosis en las células leucémicas LBC tratadas con CsA e investigar la regulación de la expresión de los genes de la familia del *bcl2*. Las células LBC incubadas 12h con 1 o 0.5 µg/ml manifestaron características de apoptosis temprana mientras que a las 20h presentaron una manifiesta apoptosis evaluada morfológicamente por microscopía de fluorescencia, por fragmentación del ADN en geles de agarosa, por detección de hipoplóidía celular y por marcación con Annexin V analizada por citometría de flujo. Este tratamiento también inhibió la proliferación celular 51% ( $p<0.05$ ) a las 20h y un 92% ( $p<0.001$ ) a las 48h con una viabilidad del 83% y del 3% respectivamente, determinada por azul tripán. En estudios preliminares, la determinación de la proteína antiapoptótica Bcl-2 por Western blot mostró una banda de 26 kD de menor intensidad en las células tratadas con CsA respecto a las células sin tratar. Se demostró que la CsA indujo la muerte de las células leucémicas por apoptosis probablemente a través de un mecanismo que involucra la inhibición de la transcripción de los genes de citoquinas y consecuentemente la regulación de proteínas antiapoptóticas como el Bcl-2.

- 230. Comportamiento hematológico e inmune asociado al adenocarcinoma de pulmón murino espontáneo (P07).1.- Estudios en portadores de tumor.** Corina García, Isabel Stillitani, Miriam Diament, Lilia Davel, Slobodanka Klein.

Area Investigación, Instituto AH. Roffo, UBA. Bs. As.

El tumor P07, transplantado en forma s.c., metastatiza en pulmón en el 100% de los animales con una sobrevida de  $50 \pm 5$  días. El huesped presenta leucocitosis e hipercalcemia a partir del día 15 post-transplante. Para determinar el efecto sobre el reconocimiento inmune del tumor, se evaluó por el test de Hipersensibilidad Retardada (HR) en distintas etapas del desarrollo tumoral: previa leucocitosis (preL) ( $5000 \pm 450$  leucocitos/ul de sangre) y durante la leucocitosis (L) ( $15.000 \pm 1700$  leucocitos/ul de sangre) y por el ensayo de SLIA (angiogenesis inducida por linfocitos). **Resultados:** La respuesta de HR específica, en almohadilla plantar, utilizando como antígeno células P07 formalizadas, resultó positiva en todas las etapas: preL:  $0.15 \pm 0.06$ , L:  $0.17 \pm 0.09$ , Control (normal):  $0.10 \pm 0.06$  ( $p \leq 0.03$ ). El número de vasos inducidos por esplenocitos totales de preL y por células tumorales (TIA) fue positivo, no así con esplenocitos totales de L. Se determinó por Dot-Elisa en sobrenadantes de cultivo de 24 hs. que el tumor P07 produce GM-CSF. Concluimos que cuando el tumor crece en forma s.c. hay reconocimiento inmunológico por HR y activación de células esplénicas por SLIA. El tumor se produce además factores hematopoyéticos que estimulan la granulocitosis, lo cual no afecta el reconocimiento inmune a antígenos específicos.

- 231. Comportamiento hematológico e inmune, asociado al adenocarcinoma de pulmón murino espontáneo P07:2.- estudios en ex portadores de tumor.** Corina García, Teresita Manzur, Isabel Stillitani, Miriam Diament, Slobodanka Klein.

Area Investigación, Instituto A.H. Roffo, UBA, Buenos Aires.

El adenocarcinoma de pulmón murino P07, transplantado en forma s.c., induce en el huesped leucocitosis e hipercalcemia a partir del día 15 post-transplante. Nuestro objetivo fue evaluar inmunogenicidad, metástasis, leucocitosis e hipercalcemia post cirugía (Cx) del tumor primario. Resultados: Cuando la Cx se realizó en la etapa previa leucocitosis (preL), la incidencia de recidivas (rec) fue 62% mientras que efectuada durante la leucocitosis (L) fue 8% ( $p < 0.0001$ ). El n.º de metástasis pulmonares por animal (sin rec): preL:  $4 \pm 1$  y L:  $38 \pm 5$ . Al desafiar con células tumorales los animales CxpreL, el crecimiento del desafío fue mayor que en los CxL. Igual respuesta se observó en estudios de resistencia concomitante utilizando portadores de tumor en estas etapas. La Cx del tumor de ratones L ( $16000 \pm 1700$  leucocitos/ul sangre) revirtió la fórmula a valores normales a las 36-48 hs. post Cx y los valores se mantuvieron hasta 40 días. Los valores de calcio circulante también se normalizaron. Concluimos que cuando el tumor crece en forma s.c. produce factores hematopoyéticos que estimulan la granulocitosis, que puede revertirse por Cx. La fórmula sanguínea se mantiene normal en Cx aun en presencia de metástasis. Los neutrófilos circulantes inducidos por el tumor se, podrían tener una actividad antitumoral ya que la menor aparición de rec y mayor resistencia a un desafío en etapas L así lo indican.

- 232. Aumento de la angiogénesis tumoral por acción de la heparina.** G.E. Bertolesi, L. Davel, A.M. Eján y L. Lauría de Cidre.

Dto. de Biología, FCEyN e Instituto de Oncología "A.H.Roffo", UBA, Buenos Aires.

El objetivo del presente estudio fue determinar la acción de la

heparina y varias heparinas modificadas sin actividad anticoagulante [O o N desulfatadas (O-N-des) o N-acetiladas (N-Ac)] sobre la angiogénesis inducida por un tumor mamario murino de moderada capacidad metastásica en pulmón (M3). Los estudios para determinar la cinética de eliminación de la heparina después de la inoculación intraperitoneal (i.p.) (0,1 mg/ratón) mostró un pico de actividad anticoagulante a las 2 hs y regresó a los niveles basales a las 4-6 hs. Por este motivo, se inocularon las diferentes heparinas por vía i.p. cada 4 hs durante los 3 días intermedios entre la inoculación intradérmica (i.d.) ( $2 \times 10^5$ ) células tumorales y la medición de la densidad vascular (número de capilares/mm<sup>2</sup>) que se realizó el quinto día. Los resultados obtenidos fueron (media ± DS; n; \*p<0,05): control ( $3,02 \pm 0,26$ , 9); heparina ( $4,60 \pm 0,53$ , 7,\*); N-des ( $2,71 \pm 0,78$ , 8); N-des N-Ac ( $4,66 \pm 0,97$ , 10,\*); O-des ( $4,70 \pm 0,48$ , 7,\*); O/N-des N-Ac ( $4,28 \pm 0,72$ , 11,\*); y heparán sulfato ( $4,63 \pm 0,95$ , 8,\*). El tratamiento in vitro de las células con heparina y N-des N-Ac (100 µg/ml) durante 1 hora antes de la inoculación i.d. también mostró un aumento significativo en el número de capilares. Estos resultados demuestran que la heparina y varias heparinas modificadas incrementan la actividad angiogénica inducida por células tumorales siendo el efecto independiente de la actividad anticoagulante.

- 233. Detección y Acción Biológica de Receptores Androgénicos en las Líneas de Melanoma Humano: IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN.** Verónica Morvillo<sup>1</sup>, I. Luthy<sup>2</sup>, I. Bravo<sup>3</sup>, I. Capurro<sup>1</sup>, P. Portela<sup>1</sup>, R.S. Calandra<sup>1</sup> y J. Mordoh<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>LLB-"Fundación Campomar", <sup>2</sup>IBYME y <sup>3</sup>Hospital Eva Perón, Buenos Aires.

Habiendo previamente caracterizado la acción biológica de receptores androgénicos (RA) en la línea de melanoma humano IIB-MEL-J, nos propusimos extender estos estudios a otras dos líneas de melanoma humano: IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN. La determinación de RA se realizó por incubación de células enteras IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN con metiltrienolona ([<sup>3</sup>H]-R1881). El efecto de los andrógenos DHT o testosterona (T) y de los antiandrógenos hidroxi-flutamida (Flu) o Casodex (Cas) sobre el crecimiento celular se midió incubando las células tumorales en presencia de 1% de suero fetal adsorbido con carbón y concentraciones variables de los distintos compuestos. Los análisis de Scatchard revelaron constantes de disociación de 15 y 14 nM para IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN y una capacidad de unión de 18.500 y 15.400 sitios/célula respectivamente. El aumento significativo del crecimiento celular inducido por DHT o T fue inhibido por Flu y por Cas (IIB-MEL-LES/pocillo a las 240 hs: Control:  $7.500 \pm 860$ ; DHT:  $28.900 \pm 978$ ; DHT+Flu:  $12.700 \pm 2000$ ; DHT+Cas:  $14.200 \pm 554$ ; T:  $24.000 \pm 1.550$ ; T+Flu:  $12.560 \pm 990$ ; T+Cas:  $14.000 \pm 990$  y para IIB-MEL-IAN/pocillo a las 240 hs: Control:  $15.900 \pm 1.900$ ; DHT:  $57.000 \pm 2000$ ; DHT+Flu:  $12.500 \pm 2000$ ; DHT+Cas:  $28.200 \pm 1.800$ ; T:  $43.000 \pm 1.200$ ; T+Flu:  $28.000 \pm 960$ ; T+Cas:  $27.600 \pm 870$ ). La presencia de RA en las líneas celulares analizadas y la acción regulatoria del crecimiento celular mediada por andrógenos y antiandrógenos sugieren una posibilidad interesante en términos terapéuticos.

- 234. Heparanasas en células de un adenocarcinoma mamario murino.** G.E. Bertolesi<sup>1,2</sup>, G.I. Rozenberg<sup>1</sup>, J. Espada<sup>3</sup>, A. M. Ejiján<sup>1</sup> y L. Lauría de Cidre<sup>2</sup>.

*Instituto de Oncología "A. H. Roffo" Fac. de Medicina<sup>1</sup>*

*y Dto. de Biología, FCEyN<sup>2</sup>, UBA. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Fac. de Medicina, UAM, España<sup>3</sup>.*

La producción de enzimas de tipo heparanasas podría ser importante en el desarrollo tumoral durante el proceso invasivo y metastásico ya que participan en la degradación de proteoglicanos de la matriz extracelular. El objetivo del presente estudio fue detectar actividad heparanasa en células de un adenocarcinoma mamario murino de moderada capacidad metastásica en pulmón (LM3) y determinar la susceptibilidad de heparinas modificadas químicamente a ser degradadas. Desarrollamos una técnica que detecta heparinas de alto peso molecular en geles de poliacrilamida sin SDS teñidos con el fluorocromo [tris (2,2'-bipiridina) rutenio (II); -Rubipy-] y observados con luz U.V. El Rubipy se une a la heparina por interacción iónica en una relación de una molécula de colorante por cada 5-6 unidades disacáridicas de heparina, observándose 2 sitios de diferente afinidad ( $Kd_1: 3,5 \times 10^{-10}$  y  $Kd_2: 3,8 \times 10^{-11}$ ). Con esta técnica se determinó que las células LM3 ( $5 \times 10^6$  células/ml) tienen capacidad de degradar heparina y una heparina N-desulfatada N-acetilada (60 µg/ml) incubándolas 24 hs a 37°C, pero no poseen actividad sobre otras heparinas modificadas químicamente. El análisis comparativo con las heparanasas bacterianas I, II y III mostró que la enzima tumoral se asemeja a la heparanasa de tipo I en cuanto a su especificidad de sustrato.

- 235. Efectos de un análogo de Pg y de un análogo de AMPc sobre la expresión de isoformas de RPg en tumores mamarios murinos.** S. Caruso, A. Actis, V. Dorfman, E. Levin.

*Fac. Medicina -UBA, Buenos Aires.*

La hormonodependencia de tumores mamarios se asocia a la expresión de receptores hormonales en tejidos blanco, pero la sola presencia no garantiza su funcionalidad. El equilibrio entre sus isoformas es un factor que influye sobre la regulación de la transcripción genómica y depende también de interacciones con otras vías transduccionales. En tumores mamarios murinos inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA), se diferencia una sublínea hormonodependiente (hd), y otra hormonoautónoma. En este trabajo estudiamos (por HPLC-tamiz molecular), cómo se afecta el equilibrio de isoformas del receptor a progesterona (RPg) por efecto de fármacos usados en tratamientos de cáncer de mama: MPA, análogo de Pg y 8-Cl-AMPc, análogo de AMPc, en la sublínea hd. En tumores control aparece la forma oligomérica (>200 kDa) y la dimérica (~135 kDa) del RPg. Por tratamiento con MPA, desaparece el oligómero y se observa la forma dimérica, un monómero (~75 kDa) y un pico de bajo PM (~35 kDa) que puede ser un producto de degradación (mero receptor). El 8-Cl-AMPc solo, da el mismo perfil que los controles. Con la combinación MPA + 8-Cl-AMPc aparece solamente el pico correspondiente al dímero de RPg. Los efectos del MPA sobre el equilibrio de isoformas se producen vía RPg y los del MPA+ 8-ClAMPc se atribuyen a cross-talk entre proteínas de ambas vías transduccionales.

- 236. Expresión y función biológica de los receptores erbB (2,3,4) y de su ligando heregulina (lIRG) en líneas de adenocarcinomas mamarios murinos.** Lydia Puricelli, María Eugenia Balañá, J. Aguirre Ghiso, E. Charreau, Elisa Bal de Kier Joffé, Patricia Elizalde.

*Inst. de Oncología "A.H. Roffo" e IBYME, Buenos Aires.*

La expresión y actividad biológica de HRG y sus receptores con actividad tirosina quinasa (erbB2, erbB3 y erbB4), las cuales se han asociado con la progresión tumoral, se estudiaron en las líneas LM3 y LMM3. En ninguna de las líneas se detectó ARNm de HRG, empleando un ensayo de protección a la digestión por ARNasa. Mediante Western blot, ambas líneas mostraron niveles de expresión similares de erbB2, ausencia de erbB3 y un significativo aumento de erbB4 en LMM3 respecto de LM3. Se estudiaron también algunas actividades biológicas de HRG in vitro. HRG inhibió significativamente la proliferación de ambos tipos celulares, ensayada en fase log por cuantificación de la proteína celular total. Asimismo, HRG redujo en forma dosis dependiente la eficiencia de plaqueo de LM3 y LMM3 (ej. LM3 expresado en colonias/placa: Control: 128 ± 63; HRG 0,04 ng/ml: 79 ± 12 HRG 1 ng/ml: 1,5 ± 0,5; p < 0,01). No se vio efecto de HRG (hasta 0,4 ng/ml) sobre la migración, evaluada con cámaras Transwell. Por otro lado, la HRG redujo la actividad de uPA en forma dosis dependiente (0,5-2 ng/ml, p < 0,01), cuantificada en el medio condicionado por caseinólisis radial. Concluimos que las líneas tumorales murinas LM3 y LMM3, incapaces de producir HRG, responden a la misma, posiblemente a través de sus receptores erbB2 y erbB4, inhibiendo la proliferación y la producción de uPA.

**237. Efecto del Vinorelbine sobre progenitores hemopoyéticos y estroma de médula ósea de ratón.** Catalina C.B. de Di Risio, María Teresa Cuello, Marcela González Cid.

*IIHema, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.*

El citostático vinorelbine (VRB), derivado semisintético de los alcaloides de la vinca, posee un amplio espectro antineoplásico y baja neurotoxicidad. Su mecanismo de acción consiste en inhibir la formación del huso mitótico. El objetivo del siguiente estudio fue analizar su efecto *in vitro* sobre los progenitores hemopoyéticos y el estroma de médula ósea (MO) murina. Se utilizó la MO de 4 ratones Balb/c efectuándose cultivos en medio semisólido (cms) de CFU-mix (unidad formadora de colonias granulo-eritro-mono-mega-cariocítica) y BFU-E (unidad formadora de colonias bursts eritroides) según la técnica de Messner y de CFU-GM según Pick y Robinson, y cultivo a largo término (CALT) del estroma medular en medio líquido según la técnica de Dexter. Para el cms se agregó VRB a las siguientes dosis: 0,0025; 0,005; 0,01; 0,015 y 0,02 µg/ml y para CALT a las dosis: 0,025; 0,05; 0,075 y 0,1 µg/ml. Los resultados mostraron que el crecimiento de los progenitores hemopoyéticos disminuye a medida que aumenta la dosis de VRB, con ausencia total de colonias a la dosis máxima (0,02 µg/ml). A la dosis de 0,015 µg/ml el valor medio de colonias BFU-E fue de 9,3 ± 4,2 vs el cultivo control 111 ± 55,6 (p < 0,04), para CFU-GM fue de 36,3 ± 10,9 vs control 185,0 ± 33,3 (p < 0,01) y para CFU-mix se inhibió el desarrollo de colonias (control = 15,5 ± 2,3; p < 0,005). Para CALT la dosis de 0,1 µg/ml no existió crecimiento celular, observándose que a medida que disminuyó la dosis el desarrollo fue mayor. Nuestros resultados muestran la existencia de una severa toxicidad de VRB sobre las células progenitoras hemopoyéticas y el estroma de MO de ratón, demostrando éste último una resistencia cinco veces mayor al efecto de la droga.

**238. Efecto del Arsenito de Na en el desarrollo tumoral en un modelo de carcinogénesis experimental en dos etapas.** M.A. Palmieri, D. Brandizzi,

H.Lanfranchi, J.Magallanes, B.Molinari de Rey.

*Dto. Biología-FCyN-UBA; Dto. Radiobiología y Dto. Química-CNEA; Cat.Pat.Bucodental II-FO-UBA, Buenos Aires.*

En este trabajo se estudió el efecto del arsenito de Na en la generación de tumores epidérmicos en ratones Sencar sometidos a un protocolo clásico de carcinogénesis experimental en dos etapas: iniciación con DMBA/promoción con TPA durante 7 meses. El arsenito fue suministrado en el agua de bebida en una concentración de 20 mg/l. La solución se preparó diariamente a partir de una solución madre que fue conservada bajo estrictos controles de calidad. Se consideraron 4 condiciones experimentales: i)Control, ii)Arsenito durante la promoción, iii)Arsenito previo a la promoción, y iv)Arsenito antes y durante la promoción. Se evaluaron semanalmente los siguientes parámetros: peso de los ratones, nro. de tumores/ratón, porcentaje de ratones con tumor y evolución del tamaño tumoral. Además se realizó un diagnóstico patológico de las neoplasias. Si bien se observó una aparición precoz de tumores en los animales que bebían arsenito (iv), éstos mostraron 14,14 ± 1,73 tumores/ratón al cabo de 7 meses, mientras que en los controles este valor fue de 20,13 ± 1,87 tumores/ratón (P < 0,05). No hay diferencias significativas en los otros parámetros analizados. Se pudo demostrar que el arsenito de Na suministrado en el agua de bebida, modifica el desarrollo del proceso carcinogénico, probablemente induciendo un estado prooxidante en los animales que se traduce en un menor desarrollo tumoral durante el proceso de carcinogénesis en dos etapas.

**239. Actividad telomerasa en timomas y adenocarcinomas de mama producidos por virus poliomielítico en ratones AKR..** J. Otero, S. Perazzo, M. Gómez Carrillo y N. Sanjuan.

*Laboratorio Experimental, Dept. Microbiología, Fac. de Medicina, UBA, Buenos Aires.*

La Telomerasa es una enzima ribonucleoproteica que cataliza la síntesis de las secuencias repetitivas de DNA que forman parte del telómero. Ha sido asociada a la génesis de neoplasias malignas humanas, y propuesta para el diagnóstico de algunos cánceres. El propósito de este trabajo fue estudiar la actividad Telomerasa en tumores producidos por virus Poliomielitis. Se emplearon ratones AKR, que fueron inoculados por vía subcutánea dentro de las primeras 24 hs de vida con 10<sup>5</sup> ufp de virus Poliomielitis, cepa PTA. A los 3 meses post-infección, 20/20 animales desarrollaron epitelios tímicos, y en 2/20 se detectaron carcinomas intraductales de mama. La presencia de antígenos de Poliomielitis en los tumores fue determinada por inmunomarcación con peroxidasa-antiperoxidasa, y Western blot contra la proteína mayor de la cápside viral. La actividad Telomerasa fue detectada por el ensayo TRAP, que consta de una primera fase de síntesis de secuencias teloméricas, con posterior amplificación por PCR. Los productos fueron resueltos en geles de poliacrilamida. Se encontró que existía actividad Telomerasa en las neoplasias de mama, pero no en el tejido mamario normal. El timo normal, en cambio, mostró mayor actividad Telomerasa que los timomas. Esto demuestra que la actividad Telomerasa está involucrada en la patogenia de cánceres producidos por virus con DNA, y tendría patrones de regulación en diferentes tipos de tumores.

**240. Efecto del tamoxifeno sobre la hepatocarcinogénesis.** Fabiana Caballero, L.Olivieri, E.Gerez,

E.Vazquez, A.Batlle.

*Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfírias (CIPYP). CONICET .UBA, Buenos Aires.*

El tamoxifeno (TAM), utilizado en terapias adyuvantes de cáncer de mama, induce el desarrollo de carcinoma hepatocelular en ratas y es promotor de hepatocarcinogénesis (HC). Considerando que la historia natural de las enfermedades neoplásicas hepáticas es similar en roedores y humanos, decidimos estudiar el efecto del TAM durante el estadio de iniciación de la HC química. Ratones machos CF1 recibieron p-dimetilaminoazobenceno (DAB) (0,5% p/p) en la dieta y fueron sacrificados luego de 8, 11 y 19 semanas; a los 15 días de iniciado el tratamiento con DAB un grupo de animales recibió TAM (0,025% p/p). La actividad del ALA-S ( $VN = 1,4 \cdot 10^4 \pm 0,3 \cdot 10^4$  U/mg) alcanzó el máximo de inducción ( $3,02 \cdot 10^4 \pm 0,6 \cdot 10^4$  U/mg) a las 8 semanas del tratamiento con DAB, disminuyendo luego hasta alcanzar una inhibición del 40% ( $0,84 \cdot 10^4 \pm 0,2 \cdot 10^4$  U/mg) en la semana 19. La administración de TAM + DAB no produjo cambios. El P 450 ( $VN = 0,34 \pm 0,03$  U/mg) mostró una respuesta similar. La actividad de MHO disminuyó entre las semanas 8 y 11 del tratamiento con DAB, alcanzando los niveles basales ( $2,25 \pm 0,11$  U/mg) en la semana 19. La actividad de la enzima marcadora tumoral, GST ( $VN = 1,45 \pm 0,25$  U/mg), aumentó en todos los grupos (50-100%). Nuestros estudios demostraron que la administración prolongada de DAB conduciría al modelo de hepatocito resistente y que el TAM, bajo este protocolo, no actuaría como agente iniciador, ni promotor, ni preventivo de la HC.

**241. Estudios de hibridización genómica comparada (CGH) en neoplasias mieloideas.** MV. Castuma, S. Acevedo, I. Larripa.

*IIHema. Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.*

CGH es una nueva técnica citomolecular que permite detectar ganancias y pérdidas de material genético en la célula tumoral. Se basa en la hibridización simultánea de DNA tumoral y normal sobre metasas normales. En este trabajo se realizó un estudio comparativo entre la citogenética convencional y CGH en 20 pacientes con neoplasia mieloide a fin de evaluar la utilidad de esta nueva metodología. Se realizó el estudio citogenético y la extracción de DNA a partir de muestras de médula ósea. El DNA fue procesado según el protocolo de Kallionimeni. El estudio citogenético mostró alteraciones cromosómicas en el 50% de los pacientes, mientras que estos valores se incrementaron en un 75% por CGH. Se detectaron cambios adicionales no identificados por citogenética en 13 casos: 5 con cariotipos normales, 2 sin metasas analizables y 6 con cariotipo anormal. Las ganancias cromosómicas fueron más frecuentes que las pérdidas y constituyen el 67% de todos las alteraciones detectadas siendo las más frecuentes las ganancias de los cromosomas 1, 17, 21 y 18p. Nuestros datos demuestran que CGH no sólo permite detectar los desbalances cromosómicos identificados por Bandeo G sino que también muestra la presencia de alteraciones adicionales presentes en al menos el 30 % de la población medular. Sin embargo, esta técnica no permite identificar translocaciones balanceadas indicando que la citogenética y el CGH son herramientas complementarias para la caracterización del clon neoplásico.

**242. Expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular en adenocarcinomas mamarios murinos tratados con el antiprogestágeno RU486.** M. Goin, G. Peters, S. Vanzulli, P. Elizalde, C. Lanari y E. Charreau.

*Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires.*

El objetivo de este trabajo fue correlacionar el efecto inhibitorio del crecimiento tumoral del RU486 con la expresión de moléculas involucradas en el control de la proliferación celular: ciclina D1 (subunidad regulatoria de las quinasas dependientes de ciclinas, CDK4, 5 y 6) y p21 (WAF1), inhibidor de los complejos ciclinas /CDKs. Además se estudió la expresión p185erbB2, que de acuerdo a resultados del laboratorio, aumenta en respuesta a progestágenos. Se utilizó el adenocarcinoma de mama ductal C7H1, inducido por acetato de medroxiprogesterona, de comportamiento progestágeno independiente y que expresa receptores para progesterona. Dicho tumor sobreexpresa las ciclinas D1 y D3 sin amplificación de los genes respectivos. Ratones hembras de la cepa BALB/c portadores de tumor ( $20\text{mm}^2$ ) se trataron con RU486 (90 $\mu\text{g}/\text{día}$ ) o permanecieron sin tratar. Se observó una disminución del crecimiento tumoral (día 7, tamaño, control:  $36,6 \pm 5,3$   $\text{mm}^2$  vs RU:  $9,7 \pm 3,2$   $\text{mm}^2$ ). Se prepararon hornogenatos totales de los tumores extraídos luego de 24, 48 y 72 hs. post tratamiento con RU486. Mediante ensayos de western blot se determinó un aumento significativo de la proteína p21 en todos los tiempos estudiados con respecto al tumor sin tratar. No se observó variación en la expresión de la ciclina D1. Tampoco se evidenciaron cambios en el contenido de p185erbB2. Los resultados sugieren la posible participación de p21 en la inhibición temprana de la proliferación tumoral mediada por RU486.

**243. Un mismo tumor, al crecer dentro de diferentes órganos, cambia su ritmo día/noche de mitosis y apoptosis.** R.P.Meiss y L.L. Colombo.

*IEO.F.Maissa.Acad.Nac.Med e Inst.A.H.Roffo (UBA), Buenos Aires.*

Es muy conocido que diferentes tejidos normales y tumorales poseen diferentes ritmos circadianos de sus divisiones celulares, pero nada se conoce sobre las muertes celulares y si se mantiene al crecer un mismo tumor dentro de diferentes órganos. Masas tumorales del tumor de mama murino M3, creciendo dentro de 4 diferentes sitios anatómicos, obtenidas de día (D) (11-15hs) o de noche (N) (23-03hs), fueron analizadas en cortes histológicos. Cada dato es el promedio de 20 campos de 500X / tumor / ratón. (10-20 ratones por sitio y horario). Resultados: Apoptosis: sc: D:  $2.43 \pm 0.70$  (20) Vs. N:  $4.53 \pm 0.54$  (17),  $p < 0.001$ . Pulmón: D:  $14.25 \pm 2.93$  (12) Vs N:  $10.77 \pm 1.32$  (15),  $p < 0.001$ . Peritoneo: D:  $13.83 \pm 0.44$  (10) Vs N:  $5.72 \pm 0.45$  (10),  $p < 0.001$ . Hígado: D:  $5.86 \pm 0.94$  (11) Vs N:  $10.51 \pm 0.38$  (10),  $p < 0.001$ . Mitosis: sc: D:  $5.92 \pm 1.04$  (20) Vs N:  $3.44 \pm 1.08$  (17),  $p < 0.001$ . Pulmón: D:  $4.59 \pm 1.15$  (12) Vs N:  $5.55 \pm 0.52$  (15),  $p < 0.01$ . Peritoneo: D:  $6.93 \pm 0.34$  (10) Vs N:  $11.67 \pm 0.62$  (10),  $p < 0.001$ . Hígado: D:  $10.44 \pm 0.47$  (11) Vs N:  $5.26 \pm 0.28$  (10),  $p < 0.001$ . Conclusiones: 1] Existe un ritmo circadiano de las apoptosis espontáneas. 2] El ritmo de mitosis y apoptosis de un mismo tumor cambia al cambiar el órgano dentro del cual crece

un mismo tumor. La importancia es para: a) La cronofarmacología tumoral, pues deberá influir no sólo la hora del día sino también si es primario o dentro de cual órgano se encuentran creciendo las metástasis. b) La búsqueda de los factores producidos circadianamente por un órgano que favorezcan la división o muerte de las células metastásicas.

- 244. Aumento de la uroquinasa secretada por células de carcinoma mamario en respuesta a la formación de fibrina in vitro.** DF Alonso, Mariana De Lorenzo, Agueda Tejera, DE Gomez.

*Laboratorio de Oncología Molecular, Departamento de Ciencia y Tecnología, UNQ, Buenos Aires.*

Muchos tumores pueden activar al mismo tiempo mecanismos de la coagulación y fibrinólisis. El depósito de fibrina extravascular provee una matriz temporal para el crecimiento tumoral y la angiogénesis. La degradación de las matrices tisulares iniciada por la enzima profibrinolítica uroquinasa (uPA) es un requerimiento crítico para el proceso de invasión y metástasis. Examinamos la relación entre la actividad procoagulante de las células F3II de carcinoma mamario murino y su capacidad de producir uPA. La actividad procoagulante se cuantificó midiendo el tiempo de recalcificación en presencia de plasma de ratón. El uPA secretado por monocapas subconfluentes se estudió en medios condicionados libres de suero mediante zimografía y caseinólisis radial. Las células F3II promovieron la conversión del fibrinógeno purificado en fibrina, acortando el tiempo de recalcificación (Control PBS:  $929 \pm 279$  vs Células F3II:  $106 \pm 10$  segundos;  $p < 0.001$ ). El uPA secretado por los cultivos de F3II no se modificó con el agregado de fibrinógeno soluble (3 mg/ml). En cambio, la conversión del fibrinógeno en fibrina durante la incubación, merced a la incorporación de cloruro de calcio (10 mM) y trazas de plasma (dilución final, 1:125), se asoció con un aumento significativo en la secreción de uPA (Control:  $1.42 \pm 0.18$  vs Fibrina:  $2.95 \pm 0.37$  UI/ $10^6$  células/24 horas;  $p < 0.01$ ). Los resultados indican que el depósito de fibrina inducido por el propio tumor podría estimular

la secreción de uPA, sugiriendo un rol cooperativo entre los mecanismos de coagulación y fibrinólisis en la biología de células de carcinoma mamario.

- 245. Biopsias por punción con aguja fina (BPA) de carcinoma de próstata: evaluación de marcadores de comportamiento tumoral.** M Maffini, L Kass, R Giardina, M Muñoz de Toro, EH Luque.

*Lab. Endocrinología y Tumores Hormonodependientes. Fac. y Bioquímica y Cs. Biológicas. UNL. Santa Fé.*

El pronóstico del carcinoma de próstata se establece generalmente por parámetros histopatológicos; sin embargo en biopsias por punción con aguja fina (BPA) esto no es posible. El objeto de nuestro trabajo fue evaluar la expresión de marcadores de comportamiento tumoral que permitan reemplazar en BPA a los parámetros convencionales. Las células obtenidas de 28 punciones fueron procesadas hasta su inclusión en parafina; se consideraron óptimos aquellos cortes con 200 o más células tumorales. Se evaluó el pleomorfismo nuclear (PN) y la expresión immunocitoquímica de Ki-67, bcl-2 y receptor de andrógenos (RcA). El Ki-67 se tomó como referente por su probado valor pronóstico. La expresión de Ki-67 mostró una alta correlación ( $r_s: 0.44$ ;  $p < 0.05$ ) con el pleomorfismo nuclear. Aquellos tumores con  $\geq 7.5\%$  de sus células Ki-67+ (33.3% del total) fue clasificado de alto índice de proliferación (IP). La sobreexpresión de bcl-2 fue mayor en los tumores con alto IP (44.4% vs 11.1%), mientras que el RcA se expresó tanto en los tumores con alto IP (77.8%) como en los de bajo IP (66.7%). Estos resultados muestran que en BPA hay una alta correlación entre expresión de Ki-67 y el pleomorfismo nuclear, que la expresión del RcA no está asociada con proliferación celular y que un alto porcentaje de los tumores con alto IP poseen inhibida la apoptosis (sobreexpresión del bcl-2). Esta última asociación podría ser de utilidad para seleccionar un subgrupo de pacientes con peor pronóstico. Estudios de sobrevida permitirán corroborar esta hipótesis.

## Cardiovascular

- 246. Anticuerpos anti-receptor muscarínico M<sub>2</sub> en pacientes chagásicos con disautonomía cardiovascular. Acción sobre la frecuencia cardíaca.** Juan Carlos Goin, S Auger, R Storino, E S Borda, L Sterin-Borda .

*CEFYBO-CONICET. Cátedras de Farmacología. Facultades de Odontología y Medicina. UBA. Servicio de Cardiología. Hospital Santojani. Fundación Favaloro, Buenos Aires.*

Previamente demostramos la presencia de anticuerpos séricos anti-receptor muscarínico M<sub>2</sub> humano (Acs a-RM<sub>2</sub>) en pacientes chagásicos (Pch) no cardiópatas con disfunción autonómica cardiovascular (DAC). En este trabajo se investigó la asociación entre presencia de Acs a-RM<sub>2</sub> circulantes y evidencia de bradicardia (B) en pacientes chagásicos con distinto grado de cardiopatía (CP). Asimismo se evaluó el efecto de la fracción IgG a-RM<sub>2</sub> sobre la frecuencia cardíaca y sobre los niveles basales de AMPc en la aurícula aislada de rata. Al estudiar 17 Pch (Grupo I: sin CP, n=8; Grupo II: con CP no dilatada, n=7; Grupo III con CP dilatada, n=2), se detectó la presencia de Acs a-RM<sub>2</sub> circulantes en 8 de 9 Pch con B y en 1 de 8 Pch sin B, indicando una fuerte asociación entre B y presencia de Acs a-RM<sub>2</sub> circulantes en los Pch ( $\chi^2=5.83$ , p<0.025). La fracción de Acs a-RM<sub>2</sub> purificados del suero de Pch inhibieron la frecuencia cardíaca (Basal: 130±8 l/min; Acs a-RM<sub>2</sub>: 97±5 l/min; n=5; p<0.05) y los niveles de AMPc (pmol/mg) (Control: 2.4±0.2; Acs a-RM<sub>2</sub>: 1.2±0.2; n=6; p<0.01) en aurículas aisladas de rata. Estos efectos fueron bloqueados por Atropina y AFDX-116 (ambos 5x10<sup>-7</sup>M). Estos resultados sugieren que los Acs a-RM<sub>2</sub> circulantes podrían participar en la patogénesis de la DAC a través de su efecto cronotrópico negativo.

- 247. Variantes alélicas de los genes del angiotensinógeno (Ao) y de la enzima de conversión de la angiotensina I (ECA) e hipertensión arterial (HTA) en adolescentes.** P.I. Porto, S.I. Garcia, R.Simsolo, D.Shaurli, B.Grunfeld, C.J.Pirola.

*IDIM A. Lanari, UBA; FEHYLIN, Htal de Niños R. Gutierrez, Buenos Aires.*

El polimorfismo por inserción (I)/deleción (D) de un fragmento Alu de 287 bp en el intrón 16 del gen de la ECA y las variantes alélicas del Ao (M235T y T174M en el exón 2) estarian asociadas a patología cardiovascular. En este trabajo estudiamos la distribución de los polimorfismos I/D del gen de ECA y de las variantes M235T y T174M del Ao en adolescentes normotensos con (HH, n=71, 46% mujeres) y sin (HN, n=30, 60% mujeres) antecedentes familiares de HTA mediante PCR y RFLP/ALSO. No existieron diferencias significativas entre los dos grupos con respecto a la frecuencia (%) de los alelos I/D de la ECA (HH/HN:II 32/37, ID:33/47, DD:35/17), ni de los alelos M235T (HH/HN: MM:28/44, MT: 50/44, TT: 22/12) ó T174M (HH/HN: TT:80/78, TM:18/22, MM: 2/0). Los genotipos se hallan en equilibrio de Hardy Weinberg. Si, se observó una significativa elevación de la presión arterial diastólica normalizada por edad y sexo en la población total de portadores del alelo 174M del Ao (Z score: TT 0.39±0.12 vs TM+MM: 1.03±0.28, p<0.05, Mann-Whitney test).

En síntesis, la variante 174M del Ao determinaría un aumento significativo de la presión arterial diastólica desde edad temprana. Debido a su escasa frecuencia deberían analizarse un número mucho mayor de individuos para poder demostrar una mayor prevalencia de este alelo en la población de riesgo. El genotipo de la ECA no estaría asociado a HTA.

- 248. Participación del receptor de adenosina en la tensión contráctil cardíaca. Señales intracelulares involucradas.** Gabriela Gorelik, E.Borda, L.Sterin-Borda.

*CEFYBO-CONICET, Buenos Aires.*

El miocardio es rico en receptores de adenosina subtipo A<sub>1</sub>. La activación de los mismos induce inotropismo y cronotropismo negativo. Este último ha sido asociado a la inhibición de la adenilato ciclase. En este trabajo hemos estudiado el mecanismo involucrado en el inotropismo negativo. Se midió dF/dt de aurículas aisladas de rata en presencia de concentraciones crecientes del R(-)PIA, agonista específico A<sub>1</sub>. Se observó una inhibición del dF/dt en el rango 10<sup>-9</sup>-10<sup>-6</sup>M (ED<sub>50</sub>: 1.2x10<sup>-7</sup>M), efecto que fue bloqueado por el antagonista específico A<sub>1</sub>, DPCPX (10<sup>-9</sup>M). Por su parte, la inhibición de la NOS con L-NMMA 10<sup>-6</sup>M, de PKC con staurosporina 10<sup>-7</sup>M y de calcio-calmodulina con TFP 5x10<sup>-6</sup> M, inhibieron el inotropismo negativo inducido por PIA (p<0.01) Por este motivo se dosaron los niveles de NO e inositoles fosfato en presencia de PIA, obteniéndose estimulaciones dependientes: NO control: 460±30 pmol/g, PIA 10<sup>-8</sup>M: 620±45 pmol/g, n=5; IP control: 41 ± 6 área/mg, PIA 10<sup>-8</sup>M: 60 ± 8 área/mg, n=4. Ambos efectos fueron inhibidos por DPCPX. Por otro lado, el bloqueo de PKC y de calcio-calmodulina, inhibieron parcialmente el efecto estimulador del PIA sobre NOS. Los resultados indican que el efecto inotrópico negativo por estimulación A<sub>1</sub>, estaría mediado por señales intracelulares que involucran la activación de NOS con participación del ciclo de PI, PKC y Ca-calmodulina.

- 249. Reconocimiento de epitopes antigenéticos de receptores (R) B<sub>1</sub> adrenérgicos (B<sub>1</sub>) y M<sub>2</sub> muscarínicos colinérgicos por un anticuerpo monoclonal (MAb) anti-T.cruzi.** Graciela Cremaschi, G.Gorelik, N.Zwirner, J.C.Goin, E.Malchiodi, E.Borda, A.Fossati, L.Sterin-Borda.

*CEFYBO-IDEHU-CONICET, Buenos Aires.*

Resultados previos demostraron que un MAb murino dirigido contra una proteína de 150 KDa del *T.cruzi*, era capaz de activar R a neurotransmisores (Nt) cardíacos. En este trabajo analizamos la interacción directa entre el MAb y péptidos sintéticos correspondientes al 2º loop del R B<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>. Comprobamos que el MAb, y en forma semejante su fragmento Fab, incrementa la contractilidad del miocardio murino BALB/c (9.2 ± 0.8; basal: 4.1 ± 0.3 g/s, n=6) bloqueable por el antagonista B<sub>1</sub> propranolol, observándose una inhibición de la tensión cardíaca (-28 ± 4%, n=6). Este último efecto fue bloqueado por el antagonista muscarínico, atropina. La preincubación del MAb con el péptido

$\beta_1$  indujo efectos semejantes al propranolol ( $-30 \pm 5\%$ ), mientras que con el péptido  $M_2$  ejerció efecto estimulante ( $82 \pm 10\%$ ). La preincubación con ambos péptidos anuló la acción del MAb sobre la contractilidad. Por ensayos de unión específica, el fragmento Fab del MAb, produjo inhibición de la unión del  $^{125}\text{I}$ -CYP y  $^3\text{H}$ -QNB en membrana cardíaca respecto al control (Fab  $10^{-7}\text{M}$ :  $45 \pm 6$  y  $24 \pm 4\%$  de inhibición respectivamente). Ensayos de ELISA mostraron que el MAb era capaz de reconocer específicamente al péptido  $\beta_1$  y  $M_2$ . Los resultados indican que el MAb y su fragmento Fab son capaces de reconocer epitopes antigenicos del R  $\beta_1$  y  $M_2$ . Estos resultados justificarían la aparición de anticuerpos séricos anti-R a Nt, asociado con el desarrollo de la disautonomía cardíaca chagásica humana.

**250. Activación del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE) por estiramiento de las fibras miocárdicas** Irene Ennis, B. Alvarez, M.C de Hurtado, H.Cingolani.

*Centro de Investigaciones Cardiovasculares. La Plata.*

El estiramiento del miocardio produce modificaciones en mensajeros intracelulares vinculados al desarrollo de la hipertrofia cardíaca. Como la alcalinización citoplasmática se considera una señal para el crecimiento celular, investigamos la posible relación entre pH intracelular ( $\text{pH}_i$ ) y estiramiento. Se usaron músculos papilares de gato contrayéndose a frecuencia constante (0.2Hz) en solución salina libre de bicarbonato a  $30^\circ\text{C}$  en los que se midió el  $\text{pH}_i$  por epifluorescencia con BCECF-AM. Los músculos fueron estirados hasta desarrollar la fuerza máxima ( $L_{max}$ ) y luego desestirados hasta una longitud ( $L_1$ ) equivalente al 93% de  $L_{max}$ . Una vez estabilizados en  $L_1$  se los estiró rápidamente hasta  $L_{max}$  durante 10 minutos y se los desestiró hasta  $L_1$ . La tensión de reposo aumentó por el estiramiento de  $0.11 \pm 0.02$  a  $0.20 \pm 0.02$  g/mm $^2$ . El NHE es el único mecanismo que interviene en el control del  $\text{pH}_i$  en ausencia de bicarbonato. El  $\text{pH}_i$  basal fue  $7.04 \pm 0.04$  ( $n=12$ ) y aumentó  $0.11 \pm 0.02$  unidad ( $p<0.05$ ) durante el estiramiento. El máximo aumento se alcanzó a los  $7.5 \pm 0.6$  min y retornó al valor basal al desestirar hasta  $L_1$ . El aumento del  $\text{pH}_i$  se suprimió por: a) inhibición específica del NHE (EIPA, 5 $\mu\text{M}$ ); b) bloqueo de los receptores AT<sub>1</sub> (losartan, 10 $\mu\text{M}$ ); c) inhibición de la proteína quinasa C (PKC) (chelerythrine, 1 $\mu\text{M}$ ); d) bloqueo de los receptores de endotelina (PD142893, 50nM). Por lo tanto, el aumento del  $\text{pH}_i$  por el estiramiento se debe a la activación del NHE a través de mecanismos autócrinos-parácrinos que involucran la liberación de angiotensina II, endotelina y PKC. Estos resultados constituyen la primera demostración en tejido miocárdico adulto de la cadena de eventos que traducen la señal mecánica.

**251. Efecto del péptido auricular natriurético (ANP) sobre la óxido nítrico (NO) sintetasa del endotelio vascular.** M.Costa<sup>a</sup>, L.González Bosc<sup>a</sup>, F.Capani<sup>b</sup>, J. J. López - Costa<sup>b</sup>, A. Giofre<sup>b</sup>, C. Arranz<sup>b</sup>, A. Balaszczuk<sup>c</sup>, N.Vidal<sup>c</sup>, J. Pecci Saavedra<sup>b</sup>.

\*Biol. Cel. Histol., <sup>a</sup>Fisiología, Farm. y Bioq., <sup>b</sup>Biol. Cel. Histol., Medicina, UBA. <sup>c</sup>PROSIVAD CONICET, Buenos Aires.

La administración de un inhibidor de la NO sintetasa (L-NAME 3mg/Kg) a ratas anestesiadas e infundidas con ANP (0.2(g/Kg/min) revierte el efecto hipotensor de dicho péptido. La administración simultánea de ANP (5(g/Kg) y L-arg (200mg/

Kg) potencia la disminución de la presión arterial inducida por el ANP. La inyección previa de L-NAME inhibe la respuesta hipotensora del ANP. Con el propósito de estudiar la posible relación entre el ANP y el NO, se midió la actividad NADPH diaforasa de la enzima NO sintetasa en el endotelio de la aorta (A) y de las arteriolas de la submucosa del tractogastrointestinal (TG) de ratas controles e infundidas con ANP, según la técnica desarrollada por Vincent y Kimura, 1992. La observación, medición de la DO y las fotografías se realizaron con un microscopio Zeiss Axiophot. DO de A ( $n=10$ ): control= $0.49 \pm 0.01$  vs ANP= $0.590 \pm 0.006$  ( $p<0.0001$ ). DO de TG ( $n=20$ ): control= $0.317(0.005$  vs ANP= $0.370(0.006$  ( $p<0.001$ ). Por lo tanto, el endotelio de las arterias provenientes de ratas infundidas con ANP, es más reactivo que el de los controles. Estos resultados muestran que el ANP aumenta la actividad de la NO sintetasa, lo cual implicaría un aumento de la producción de NO. Esto sugiere que el NO participa en la respuesta hipotensora del ANP.

**252. Alteraciones del reflejo presorreceptor en los modelos de expansión extracelular e intravascular en ratas despiertas.** A. Fellet, A. Giofre, M.A.Costa, C. Arranz y A.M.Balaszczuk.

*Cát. de Fisiología, Fac. de Fcia. Y Bioq. UBA. PROSIVAD CONICET, Buenos Aires.*

Se estudió el reflejo presorreceptor en dos modelos de sobrecarga de volumen en rata: expansión del volumen extracelular (A) y expansión intravascular (B). Los animales, anestesiados con éter, fueron canulados en la vena yugular, para infusión y administración de drogas, y en la arteria femoral para el registro de presión arterial (PA) y de frecuencia cardíaca. En las ratas despiertas, se evaluó el reflejo presorreceptor mediante el aumento de la PA con un bolus de fenilefrina (6  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ), obteniendo curvas de presión sistólica en función de intervalo de pulso, siendo la pendiente de la curva de regresión igual a la sensibilidad del reflejo. Luego de un período de hidratación, las ratas fueron divididas en grupos y expandidas según el siguiente protocolo: A - infundidas con solución fisiológica durante 30 min. (CA) y luego expandidas durante 30 min. con solución fisiológica en un 15% del peso corporal (EA). B- infundidas con solución fisiológica durante 30 min. (CB) y luego expandidas durante 30 min. con una solución de Álbumina (3%) en un 6% del peso corporal (EB). Resultados: Sensibilidad (mseg/mmHg): A-CA= $1.26 \pm 0.24$ , EA= $0.65 \pm 0.03$  ( $n=6$ ) ( $p<0.01$ ); B- CB =  $1.79 \pm 0.21$ , EB =  $0.91 \pm 0.18$  ( $n=6$ ) ( $p<0.01$ ). Los resultados indican que altos niveles de expansión extracelular e intravascular inducen una disminución de la sensibilidad del reflejo. Ambos modelos muestran una readaptación del mismo evidenciando alteraciones en la regulación nerviosa de la presión arterial.

**253. Regulación central de la secreción del factor natriuretico atrial (ANF) cardíaco.** M. Valta, Ana Puyó, Adriana Donoso, Liliana Bianciotti, B. Fernández.

*Dpto. Ciencias Biológicas. Fac. Farmacia y Bioquímica. UBA, Buenos Aires.*

La región AV3V del hipotálamo modula la liberación de ANF post-expansión del volumen sanguíneo. Este péptido inhibe algunas secreciones hipotálamo-hipofisarias como VP, CRF, ACTH y PRL. Nuestro objetivo fue explorar la posible existencia de una

regulación central de la secreción periférica de ANF. A ratas Wistar macho anestesiadas se les administró 1,10 o 100 ng/ $\mu$ l de ANF o de Péptido Natriurético tipo C (CNP) i.c.v. Se determinó ANF plasmático por RIA. Como ANF y CNP no modificaron la secreción basal de ANF plasmático ( $71 \pm 6$  pg/ml, n=43) se estudiaron sus efectos en ratas con volemia expandida mediante infusión del 10% de la misma con solución fisiológica (0.8 ml/100 g de peso corporal). Los valores se expresan como X  $\pm$  ES de la relación concentración plasmática de ANF a los 5 y 15 min. post-expansión/concentración plasmática de ANF durante la expansión (BE=basal expandido). Las X se compararon por ANOVA. Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

	Grupo	5 min/BE	15 min/BE
Control	(n=6)	0.5 $\pm$ 0.08	0.6 $\pm$ 0.05
ANF Ing	(n=4)	0.4 $\pm$ 0.06	0.4 $\pm$ 0.06*
ANF 10ng	(n=5)	0.4 $\pm$ 0.07	0.3 $\pm$ 0.05**
ANF 100ng	(n=4)	0.5 $\pm$ 0.01	0.3 $\pm$ 0.05**
CNP Ing	(n=4)	0.4 $\pm$ 0.06	0.3 $\pm$ 0.06#
CNP 10ng	(n=5)	0.3 $\pm$ 0.04 *	0.3 $\pm$ 0.04**
CNP 100 ng	(n=5)	0.25 $\pm$ 0.03 °	0.25 $\pm$ 0.03**

\* p<0.05; #p<0.005; \*\*p<0.001 vs. controles.

Estos resultados sugieren que ANF y CNP regularían, en el SNC, la secreción de ANF cardíaco, inhibiendo su liberación post-expansión del espacio vascular.

254. **Oxido nítrico y mioglobina en el miocardio de rata.** Constanza Lisdero, F Schöper, J. G. Peralta, María Cecilia Carreras, Cecilia Poderoso, J.J. Poderoso.

Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno. Htal de Clínicas UBA, Buenos Aires.

Introducción: El óxido nítrico (NO) 0.5-0.1  $\mu$ M disminuye la captación de O<sub>2</sub> (O<sub>2</sub> upt) por el miocardio (M) y la mioglobina (Mb) y podría ser un regulador entre los sitios de producción y la cadena respiratoria. Objetivos: Testear a la Mb como regulador de las concentraciones celulares de NO en el miocardio (M). Métodos: Los corazones de rata fueron aislados y perfundidos con buffer y soluciones de NO 2.5-10  $\mu$ M. Fueron colocados en N<sub>2</sub> líquido y se registró el espectro de Mb a 550-660 nm en slices (S) de 5-7  $\mu$ m. En homogenados (H) se determinó el O<sub>2</sub> upt y los niveles de NO (electrodos de Clark y WPI) luego de 8  $\mu$ M de succinato y pulsos de NO. Resultados: Al aumentar el NO perfundido la Mb disminuyó desde  $212 \pm 12$  a  $115 \pm 13$   $\mu$ M en los S, p<0.001. El O<sub>2</sub> upt y nivel de NO se correlacionaron inversamente con la cantidad de H agregada en función del contenido de Mb, r=0.0995, p<0.05. El suplemento de NO para inhibir el O<sub>2</sub> upt fué menor en el miocardio previamente infundido con NO. Conclusión: Probablemente la Mb controla los niveles steady state de NO en el miocardio dentro de rangos no tóxicos al ligar NO a sus grupos hemo.

255. **Efecto inotrópico cardíaco de la eritropoyetina a través de la modulación de la actividad de Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasa.** Miriam Wald<sup>1,3</sup>, C.E. Bozzini<sup>2</sup>, Agustina Vila-Echagüe<sup>1</sup>, Cristina Barceló<sup>2</sup> y Leonor Sterin-Borda<sup>1</sup>.

CEFYBO-CONICET<sup>1</sup>, Cátedra de Farmacología<sup>3</sup> y Fisiología<sup>2</sup>, FOUBA, Buenos Aires.

Hemos demostrado una acción mitogénica de eritropoyetina (EPO) sobre cardiomiositos asociada a la activación de Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasa cardíaca. Considerando la importancia de la actividad de esta enzima sobre la contractilidad cardíaca, el presente estudio fue realizado para determinar el posible efecto de EPO sobre la misma. Ratones CF1 adultos fueron sometidos a diferentes condiciones experimentales capaces de modificar la secreción y el nivel plasmático de EPO, que fue evaluado indirectamente cuantificando la eritropoyesis mediante incorporación de <sup>59</sup>Fe al eritrón (%<sup>59</sup>Fe). Se registró la actividad contráctil de aurículas aisladas de 10 ratones/grupo, que fue expresada como dF/dt (g/seg). Los valores estimados fueron los siguientes: normal (N) (%<sup>59</sup>Fe=30.7±2.4, dF/dt=4.2±0.2), hipoxia aguda (hxa) (exposición a 507 hPa x 72 h, 48.3±2.8 y 6.8±0.3), rH-EPO (400 U/Kg x 2 días, 44.0±1.8 y 5.1±0.3), policitemia transfusional (1.2±0.1 y 3.0±0.2), policitemia transfusional + rH-EPO (18.4±1.3 y 4.5±0.3), policitemia transfusional + hipoxia aguda (2.7±0.1 y 3.2±0.2), hipoxia crónica (507hPa x 13 días, 23.4±2.7 y 2.8±0.2), N+anti-EPO (csp EPO/24 ml plasma, 2.16±0.18 y 3.2±0.3), hipoxia aguda + anti-EPO (csp EPO/72 ml plasma, 2.30±0.17 y 3.6±0.3). Ouabaina (5x10<sup>-4</sup>M) incrementó el dF/dt a 4.8±0.3 en ratones N, a 11.5±0.5 en hxa y a 15.3±0.8 en N+rH-EPO. Estos efectos mostraron correlación positiva con la actividad de Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasa cardíaca ( $\mu$ mol/mg prot/h) N=3.5±0.3, hxa=5.9±0.5 y N+EPO=6.1±0.5. El tratamiento con anti-EPO revirtió la potenciación que EPO ejerce sobre los efectos de ouabaina. Los resultados indican que EPO mejoraría la actividad contráctil cardíaca a través de la modulación de Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasa.

256. **Estudio mecánico y electrofisiológico del efecto de 4-aminopiridina (4-AP) en vena safena humana.** Verónica Milesi, A. Rebollo, Alicia Gomez Alvis, Angela Grassi de Gende.

Cátedra de Anatomía y Fisiología, Depto. de Cs. Biológicas, Facultad de Cs. Exactas, UNLP, La Plata.

Segmentos de vena safena humana (VSH) remanentes de cirugía de revascularización miocárdica fueron usados para estudiar el efecto de 4-AP, bloqueante de las corrientes de K<sup>+</sup> mediadas por canales del tipo rectificador tardío (K<sub>DR</sub>). Experimentos mecánicos en anillos intactos mostraron que 4-AP (5 mM) induce un desarrollo de fuerza equivalente al 141±44 % de una contracción de CIK 80 mM. En células aisladas, determinaciones electrofisiológicas con la técnica de "patch clamp" en configuración "whole cell" permitieron identificar una corriente saliente sensible a 4-AP 5 mM. Mediante la aplicación de un pulso de voltaje despolarizante (-60 a +60 mV) de 450 ms de duración, y teniendo en la pipeta de "patch" una concentración de EGTA de 10 mM se obtiene una corriente macroscópica neta de 21.4±6 pA/pF y de 23.2±7 pA/pF (n=4) medidas al comienzo (70 ms) y al final (350 ms) del pulso del voltaje, respectivamente. La aplicación de 4-AP 5 mM produce una disminución de la corriente a valores de 13.6±4 pA/pF al comienzo (bloqueo del 37%) y 16.5±5 pA/pF al final (bloqueo del 29%). La corriente sensible a 4-AP presenta la inactivación característica de la corriente transportada por los canales de K<sub>DR</sub>. Estos resultados muestran que las células de músculo liso de VSH poseen canales de K del tipo K<sub>DR</sub> y que el bloqueo de los mismos produce contracción del músculo liso vascular.

257. **Formación de agregados de plaquetas-PMN en sangre entera de pacientes con reem-**

**plazo mecánico de válvula cardíaca.** N Maugeri,  
M Nanni, MA Lazzari.

Dept. Hemost. y Tromb. Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.

En trabajos anteriores hemos determinado que los PMN de pacientes con reemplazo mecánico de válvula cardíaca (RMVC) están preactivados y que presentan una incrementada proporción de agregados mixtos de plaquetas y leucocitos en circulación. Las muestras de sangre venosa citratada de 50 RMVC, 40 pacientes control (20 con fibrilación auricular, 20 con miocardiopatía dilatada) fueron incubadas a 37°C, agitadas (1000rpm) y estimuladas con fMLP 0.5uM. Se determinó expresión de CD11b, CD62P y de agregados mixtos por citometría con marcación bicolor. Resultados (Media ± SEM), basal de CD11b fue similar en ambos grupos RMVC: 602±53; control: 583±83, mientras que el de CD62P fue mayor en RMVC: 130±22 vs 65±15 ( $p<0.001$ ), así como la proporción de agregados mixtos: RMVC 252±60; control 93±21 ( $p<0.001$ ). El estímulo indujo un incremento en la proporción de agregados mixtos sólo ( $p<0.005$ ) en RMVC: 154±14% del valor basal (controles: 92±10), hallándose directamente proporcional ( $r=0.991, p<0.0001$ ) al incremento en la expresión de CD11b en RMVC: 149±22, controles 48±12% del basal. No se observaron diferencias de la expresión basal de CD62P por el tratamiento con fMLP. El estímulo de los leucocitos se tradujo en la marcada expresión de CD11b y en la formación de agregados mixtos sólo en los pacientes RMVC. Sin descartar que la presencia de plaquetas activadas pueda ser indispensable, nuestros resultados marcan la diferencia en la dinámica de la interacción de las células sanguíneas en condiciones fisiológicas respecto a las patológicas.

**258. Genotipo de la enzima de conversión de la angiotensina (ECA) en normotensos e hipertensos esenciales adultos (HTA).** P.I. Porto, S.I. García, Y. Plotquin, J. Lajfer, T. Kirschner, H. Fernández, C. González, C.J. Pirola.

IDIM A Lanari y Dpto Farmacología, Fac. Med., UBA;  
Serv. Hipertensión, Htal Zubizarreta, Buenos Aires.

El polimorfismo por la inserción (I)/deleción (D) de 287 bp en el intrón 16 se asociaría a daño de órgano blanco en la hipertensión. Estudiamos la asociación de estos genotipos (PCR) con factores de riesgo en 36 normotensos (N, edad: 59±9 años, 25 mujeres) y 129 hipertensos esenciales tratados (H, edad: 55±9 años, 92 mujeres). La frecuencia (%) de los genotipos, que se hallan en equilibrio de Hardy-Weinberg, fue similar en ambos grupos (H/N; I: 24/39, ID: 53/33, DD: 22/28). Sólo se observó una significativa correlación (Spearman R: 0.67,  $p<0.001$ ) de la actividad de la ECA sérica con el genotipo en los N (I: 16.2±1.3; ID: 22.9±1.5; DD: 25.8±1.5 nmoles/ml.min). En este grupo también se observó una marcada tendencia de la masa ventricular izq. a aumentar con la dosis del alelo D (I: 88±6; ID: 96±5 y DD: 100±6). No se encontró ninguna relación entre el genotipo de la ECA y la PAS, PAD, insulina, glucemia, BMI, colesterol total, HDL, LDL y TG en ninguno de los grupos. En síntesis, las variantes del gen de la ECA no se asocian a HTA pero sí determinan los niveles circulantes de la enzima y la masa ventricular. La ausencia de tal hallazgo en los pacientes indica que la medicación, sobre todo los inhibidores de la ECA, actúa como un gran factor enmascarante. El alelo D sería un factor de riesgo genético para desarrollar hipertrofia ventricular izquierda.

**259. El precondicionamiento no preserva la función contráctil sisto-diastólica regional en ovinos conscientes.** HF del Valle, JA Negroni, EC Lascano, AJ Crottogini.

Fundación Universitaria Dr. RG. Favaloro, Inst. de Inv. en Cs.Bs.(IICB). Buenos Aires.

El objetivo fue determinar si el precondicionamiento isquémico (PI) preserva la función contráctil luego de un episodio de isquemia regional. Se utilizó un modelo de animal consciente sometido a un episodio de oclusión que no causa infarto. Diez ovinos de 5±1 meses y 30±5 Kgs se instrumentaron con sensores de presión, diámetro, oclusor coronario en el 1/3 distal de la DA y espesor de cara isquémica. El PI constó de 3 episodios de 3 min. de isquemia (Isq) y 6 min. de reperfusión (Rep) previos a la oclusión de 9 min. Cada animal fue testigo de sí mismo y los protocolos no precondicionado (NP) y PI se separaron una semana. Se midieron índices de rigidez diastólica radial (Er) y tangencial (Et); de engrosamiento sistólico (Egs) y trabajo latido (TL) regional de cara isquémica. Los valores (M±DS) medidos como porcentajes del control durante la Isq. y Rep. no mostraron diferencias significativas entre NP y PI (t, apareado):

	Et		FR		Egs		TL	
	Isq	Rep	Isq	Rep	Isq	Rep	Isq	Rep
NP	227,4 ±168,6	99,9 ±30,6	204,4 ±109,2	93,3 ±19,9	-14,6 ±22,7	58,8 ±15,51	4,9 ±26,3	71,1 ±11,2
PI	208,3 ±84,8	105 ±47,6	159,8 ±64,7	93,4 ±24,5	-8,2 ±18,7	65,4 ±16,7	8,6 ±28,5	64,9 ±15

No hubo cambios en las variables hemodinámicas globales. Concluimos que el PI en ovinos conscientes no protege de la disfunción contráctil provocada por isquemia.

**260. Estudio del Fibrinógeno Plasmático como predictor de riesgo cardiovascular.** M Moya, A Gavotto, V. Campana, L Spitale, J Palma.

Facultad de Ciencias Médicas. UNC, Córdoba.

El Fibrinógeno Plasmático (FP) se relaciona con eventos cardiovasculares. Se estudió en ratas las variaciones de FP y la anatomía patológica (AP) en endotelio de Aorta (Ao), comparado con variaciones de colesterolemia (C) y trigliceridemia (T) y AP en estres agudo. Grupos: control (I), con estres (II), estres+injuria (III), estres+injuria+dietra hipergrasa (DH) (IV). La injuria se realizó por laparotomía. La DH fue por 8 días. El estres se indujo por inmovilización. Se dosó FP (mg/100ml), C y T (mg/dl) y se estudió AP. El FP incrementó significativamente ( $p<0.001$ ) entre I (187.8 ± 10.0), II (218.8 ± 7.3), III (265.7 ± 7.0) y IV (276.3 ± 10.7). C incrementó significativamente ( $p < 0.001$ ) entre I (69.4 ± 2.4) y IV (98.7 ± 2.2) y entre III (64.0 ± 1.99) y IV. T aumentó significativamente ( $p < 0.01$ ) entre (77.3 ± 4.2) y IV (104.1 ± 8.1). En endotelio Ao del grupo III y IV: vacuolización de fibras musculares lisas, disruptión y microcalcificaciones en placas de fibras elásticas con aumento de colágeno. El estres determinaría por si solo una hiperfibrinogenemia, igual que la injuria, ambos grupos no presentan cambios AP en endotelio; pero sí en grupo III y IV con variaciones de C y T por DH y en 8 días. FP sería un predictor secundario en endotelios previamente dañados o en ateromatosis establecidas y la hiperfibrinogenemia debería mantenerse cierto tiempo.

**261. Índice de masa ventricular izquierda: relación con la presión arterial y su variabilidad en pacientes**

**Hipertensos.** P. Weissman, M. Risk, P. Castiglioni, G. Parati, M. Di Rienzo, R. A. Sánchez, G. Mancia, A.J. Ramírez.

IICB, ICYCC, Fund. Univ. Dr. RG Favaloro, Sec. Hipertensión Arterial, Bs. As. Argentina y La RC, C di Bioing, Ctro Aux, Med Int., Hosp S G, Milán, Italia.

Comparar la medición de la PA en forma continua y no invasiva con la PA de consultorio (Pac), ambulatoria (PA24h) y con el índice de masa ventricular (IMV), por ecografía. Se estudiaron 50 normotensos (NT) y 92 hipertensos (HT). Sin tratamiento (7 días). Se realizó: un registro de 24h de la PA (Spacelab), un registro continuo (1h) de la PA Finapres (Paf). Por análisis computarizado cálculo de PA y sus desviaciones standard (SDPA). Correlación entre el IMV y Pac, PA24h, Paf y SDPA. Relación entre: NT PASc:  $135.7 \pm 2.2 / 79 \pm 1.4$ ; PA24h:  $122.7 \pm 1.3 / 77 \pm 1$ ; Paf:  $138.4 \pm 2.2 / 79 \pm 1.5$ , vs HT Pac:  $155.9 \pm 1.9 / 95.8 \pm 1.2$ , PA24h:  $143.8 \pm 2.0 / 94.9 \pm 1.0$  y Paf:  $156.2 \pm 2.2 / 89.2 \pm 1.6$  ( $p < 0.01$ ). IMV NT:  $104.4 \pm 4.1$ , HT  $123.5 \pm 4.4 \text{ g/mm}^2$  ( $p < 0.01$ ). El IMV mostró una significativa ( $p < 0.05 - 0.001$ ) y positiva correlación con: PASc (NT:  $r = 0.39$ ); PADc (NT:  $r = 0.33$ , HT: 0.24); PAS24h (NT: 0.37; HT: 0.36); PAD24h (NT: 0.37; HT: 0.28); PASf (NT: 0.45, HT: 0.44); PADf (NT: 0.31, HT: 0.40) y des, SDPAf (NT: 0.34, HT: 0.31); SDDBPf (NT: 0.30, HT: 0.27). Los datos presentados muestran por primera vez, que el registro no invasivo latido a latido de la PA durante períodos relativamente cortos (1h), representaría un instrumento de utilidad en la evaluación clínica del paciente hipertenso.

**262. Efecto "protector" del Diltiazem y de la Nitroglicerina-Verapamil en arterias radiales humanas usadas para cirugía de revascularización coronaria.** G.J. Rinaldi, J. Albertal, D. Navia, E.V. Segura, R. Reginatto.

Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, e Instituto Cardiovascular de Buenos Aires, Buenos Aires.

Los implantes de arteria radial presentan alta incidencia de contracción espontánea, recurriendo a los vasodilatadores en el postoperatorio inmediato para prevenir espasmos. En este trabajo estudiamos el efecto de incubar la arteria radial con Diltiazem (DILT, 30  $\mu\text{M}$ ) o con mezcla de Verapamil-Nitroglicerina (VP-NTG, 30  $\mu\text{M}$ ) sobre la posterior contracción "in vitro" (en  $\text{g/mm}^2$ ). Las arterias ( $n=6$ ) se remitieron al laboratorio en solución fisiológica (SF) a  $0^\circ\text{C}$  inmediatamente después de extraídas, y posteriormente se cortaron en anillos y se incubaron durante 30 minutos en SF (control), en DILT o en VP-NTG. Los preparados se estabilizaron luego 60 minutos a tensión de reposo de  $1.05 \pm 0.2$ , y se estimularon con CIK 80 mM. Las tensiones máximas a los 20 min fueron de: control =  $1.63 \pm 0.36$ ; DILT =  $0.96 \pm 0.40$  y VP-NTG =  $0.63 \pm 0.25$ , significando reducciones de un  $33.4 \pm 11.3\%$  y  $45.2 \pm 20.3\%$  respectivamente ( $P < 0.05$ , ANOVA, test de Dunn). A las 24 hs se repitió la experiencia sin nueva incubación, y la contracción continuaba deprimida en un  $53.0 \pm 7\%$  y  $44.4 \pm 17\%$  respectivamente ( $P < 0.05$ ). Se concluye que ambos tratamientos podrían complementar eficazmente la terapéutica postoperatoria habitual en estos casos.

**263. Efectos de la insulina y de la inhibición del NO sobre la respuesta contráctil a endotelina 1 en aorta de rata.** A. Rebollo, Verónica Milesi, Alicia Gomez Alvis, G. Rinaldi, Angela Grassi de Gende.

Cátedras de Anatomía y Fisiología y de Fisiología Humana, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata

Se ha demostrado que la preincubación con insulina (Ins) aumenta la expresión de receptores de endotelina 1 (ET<sub>1</sub>) en músculo liso de aorta de rata. En este trabajo se preincubaron segmentos de aorta de rata con 500  $\mu\text{U/ml}$  de Ins durante 120 min. y luego se estimularon con ET. Observamos que la Ins produjo una disminución significativa en el tiempo hasta la mitad de la contracción (t<sub>1/2</sub> contr.) (Ins:  $296 \pm 17$  s vs control:  $353 \pm 20$  s,  $n=23$ ), pero no tuvo efecto sobre la fuerza máxima desarrollada (Fmáx). Para descartar que la falta de efecto de la Ins sobre la Fmáx se debiera a un aumento de la liberación de óxido nítrico (NO) se inhibió la síntesis de este relajante con L-NAME 0.1 mM. La Ins continuó disminuyendo el t<sub>1/2</sub> contr. (Ins:  $194 \pm 10$  s vs control:  $281 \pm 20$  s,  $n=15$ ), pero la Fmáx fue significativamente menor en el grupo tratado con Ins (Ins:  $118 \pm 8$  mg/mm<sup>2</sup> vs control:  $158 \pm 9$  mg/mm<sup>2</sup>,  $n=15$ ), indicando que la hormona tuvo un efecto relajante independiente de NO. El bloqueo de fosforilaciones en tirosina con genisteína 30  $\mu\text{M}$  impidió que la Ins afectara el t<sub>1/2</sub> contr. Se concluye que el pretratamiento con 500  $\mu\text{U/ml}$  de Ins acelera el desarrollo de fuerza por ET<sub>1</sub> en forma dependiente de fosforilaciones en tirosina, y que la hormona activa mecanismos relajantes del músculo liso vascular que sólo se ponen de manifiesto cuando la síntesis de NO se encuentra inhibida.

**264. Inhibición del efecto inotrópico y lusitrópico negativo de la acidosis metabólica por el bloqueo de los receptores del péptido del gen relacionado con calcitonina (CGRP) en la aurícula aislada de rata.** Alicia Gómez Alvis, A. Rebollo, Verónica Milesi y Angela Grassi.

Anatomía y Fisiología. Dpto. de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata.

El pH ácido y la hipoxia liberan neuropéptidos almacenados en las fibras nerviosas sensoriales del corazón. En las aurículas el más abundante es el CGRP con efectos vasodilatador coronario e inotrópico y cronotrópico positivos. Estudiamos en aurícula aislada de rata la respuesta mecánica a la acidosis metabólica (CO<sub>2</sub>HNa 5 mM, pCO<sub>2</sub> 40 mmHg, pH 6.80 ± 0.03,  $n=16$ ) en ausencia y presencia de CGRP 8-37, un bloqueante de los receptores del CGRP. 10 minutos de acidosis disminuyeron la fuerza pico ( $F = -41 \pm 4\%$ ), la máxima velocidad de desarrollo de F ( $+F = -43 \pm 4\%$ ) y la máxima velocidad de relajación ( $-F = -45 \pm 4\%$ ) y aumentaron la relación  $+F/F$  ( $4.4 \pm 1.6\%$ ). Estos efectos inotrópico y lusitrópico negativos se atenuaron por la presencia de CGRP 8-37 10<sup>-6</sup> M ( $F = -8.9 \pm 0.8$ ,  $+F = -12.4 \pm 2.5$ ,  $-F = -7.1 \pm 1.8$  y  $+F/F = -5.6 \pm 1.9$ ; todos  $P < 0.01$  con respecto a acidosis sin CGRP 8-37). El pretratamiento con capsaicina ( $5 \times 10^{-7}$  M), que libera CGRP de las terminales nerviosas sensoriales, seguido por dos lavados, reduce significativamente el efecto inotrópico negativo de la acidosis ( $+F = -24 \pm 1$ ;  $p < 0.01$ ). Se concluye que la disminución del inotropismo y del

lusitropismo causado por la acidosis metabólica en la aurícula aislada de rata tiene un componente relacionado con la activación de los receptores de CGRP.

- 265. Participación del óxido nítrico (NO) en la reactividad contráctil de arterias mamarias y venas safenas humanas.** A. Rebolledo, Verónica Milesi, Alicia Gómez Alvis, G. Rinaldi y Angela Grassi.

Cátedras de Anatomía y Fisiología y de Fisiología Humana. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP, La Plata.

El NO es un factor relajante sintetizado en el endotelio y en las células de músculo liso vascular. Induce relajación en vasos precontraídos y limita la respuesta contráctil en vasos estimulados con diversos agonistas. Estudiamos la participación del NO en la reactividad contráctil de arterias mamarias y venas safenas humanas estimuladas con CIK 80 mM, noradrenalina (NA) 1  $\mu$ M y adrenalina (A) 1  $\mu$ M. La fuerza desarrollada control ( $\text{gF/gP}$ ) fue mayor en arterias mamarias que en venas safenas: CIK:  $231 \pm 62$  vs  $42 \pm 9$ ; NA:  $271 \pm 102$  vs  $27 \pm 10$ ; A:  $274 \pm 23$  vs  $51 \pm 25$ . Se realizaron contracciones sucesivas en ausencia y presencia de L-NAME 0,1 mM para inhibir la síntesis de NO. En 13 anillos de arteria mamaria el L-NAME potenció la contracción inducida por CIK 80 mM en  $52 \pm 15\%$  ( $p < 0,01$ ) y en 8 venas safenas el aumento fué de  $46 \pm 23\%$  (NS). Tanto en arteria mamaria ( $n=6$ ) como en vena safena ( $n=7$ ) el L-NAME indujo aumentos variables en las contracciones inducidas por 1  $\mu$ M de NA ( $56 \pm 32\%$  y  $104 \pm 75\%$ , respectivamente; NS). La contracción por A no fue potenciada por el L-NAME en arteria mamaria ( $-19 \pm 23\%$ ,  $n=5$ , NS) y fue deprimida en vena safena ( $-48 \pm 6\%$ ,  $n=4$ ,  $p < 0,05$ ). Se concluye que el NO limita la respuesta contráctil producida por despolarización y NA, aunque esta última en forma muy variable, y en vena potencia la respuesta a la A.

- 266. Determinación de los espacios corporales en ratas con hipertensión inducida por inhibición ONS (óxido-nítrico sintetasa).** A. Tomat, S. Bellucci, A.M.Balaszczuk, C.T.Arranz.

Cát.de Fisiología, Fac.de Fcia y Bioq. UBA.PROSIVAD-CONICET, Buenos Aires.

Se ha descripto que la inhibición crónica de la síntesis de óxido nítrico (ON) induce un aumento persistente de la presión arterial (PA). El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la administración crónica de L-NAME sobre la distribución de líquidos corporales. Ratas Wistar macho, fueron tratadas con 70 mg/kg/día de L-NAME por vía oral durante tres semanas. Se midió la presión arterial sistólica (PAS) indirecta en ratas controles (C) e hipertensas (H). Se determinó el agua corporal total (ACT), contenido de agua del corazón y del riñón, volumen plasmático (VP), volemia (VOL), espacio extracelular (EEC), espacio intracelular (EIC), espacio intersticial (EI), hematocrito (Ht). Resultados ( $n=6$ ): PAS (mmHg): C =  $106 \pm 6$ , H =  $183 \pm 13$  ( $p < 0,01$ ); EEC (ml/100gr de p. Corporal): C =  $26,3 \pm 2,2$ , H =  $18,9 \pm 1,4$  ( $p < 0,01$ ); EI (ml/100 gr de p. Corporal): C =  $22,5 \pm 2,2$ , H =  $14,3 \pm 1,4$  ( $p < 0,01$ ), EIC (ml/100 gr de p. Corporal): C =  $39,9 \pm 2,8$ , H =  $47,8 \pm 0,9$  ( $p < 0,01$ ). Se observaron diferencias significativas en el contenido de agua del corazón, y en el peso seco y húmedo del riñón. Conclusión: La etiopatogenia de la hipertensión observada en este modelo podría relacionarse con

alteraciones del balance hidrosalino y en el tejido cardíaco y renal, vinculadas con una disfunción endotelial.

- 267. Efectos de la adenosina (A) sobre la aurícula (AU) y ventrículo (V) aislados de rata, expuestos a la hipoxia y la reoxigenación.** Viviana Dalamon, G. Testoni, S. Cerruti, G. Demasi, P. Kade, M. Carregal, A. Varela, E.A. Savino.

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

El objetivo fue constatar si la A mejora el funcionamiento del miocardio hipódico (gaseando con N<sub>2</sub> en vez de O<sub>2</sub>) y reoxigenado. Se montaron AU enteras latiendo espontáneamente o AU izquierdas y bandas de V derecho estimuladas a 1 Hz, en Krebs-bicarbonato con glucosa 10 mM y 750 mg de tensión de reposo. La A se agregó 30 min antes de iniciar la hipoxia, que duró 60 min o 30 min seguida de 30 min de reoxigenación. La A 50  $\mu$ M tuvo efectos ino y cronotrópicos negativos en AU aeróbicas y fue perjudicial en las hipódicas (a los 30 min  $44,6 \pm 9,1$  lat/min las controles vs  $4,4 \pm 2,9$  con A,  $p < 0,02$ ). La A 10  $\mu$ M no modificó la fuerza de la AU izquierda tanto en aerobiosis como en hipoxia ni la recuperación al reoxigenar. La A 100  $\mu$ M careció de efectos inotrópicos en el V derecho aeróbico y no modificó la caída de la fuerza y el desarrollo de contractura durante la hipoxia ni la recuperación al reoxigenar tanto en ratas alimentadas como ayunadas 24 hs. Las ayunadas liberaron menos lactato ( $4,25 \pm 0,53$   $\mu$ moles/100 mg vs  $2,83 \pm 0,18$ ,  $p < 0,02$ ) pero la A no modificó esta liberación en ambos grupos. Los resultados indican que la AU es más sensible que el V a la A, que la A es perjudicial en la AU hipódica e ineficaz en el V y que no modifica el flujo glucolítico.

- 268. Significado clínico del sentir la presión elevada.** A Corigliano, N Soding, A García, F García.

Hospital Municipal de San Isidro, San Isidro.

Los pacientes que dicen sentir la presión elevada constituyen un desafío diagnóstico. Nos propusimos comparar su presión, en un servicio de emergencias, con la de aquellos que negaban el síntoma. Se reclutaron 199 pacientes consecutivos de la guardia. Se obtuvo la presión arterial e información sobre su condición de hipertensos y síntomas como dolor, cefalea, náuseas, vómitos o visión borrosa. Se efectuó una comparación entre la presión del grupo sintomático y el asintomático en forma global y en forma restringida a la condición o no de hipertenso. Se utilizó el Test de Mann-Whitney. Luego de excluir a 13 pacientes, quedaron 186 para el análisis. La proporción de pacientes hipertensos y no hipertensos fue 28 % y 72 % respectivamente. Treinta y tres pacientes dijeron sentir la presión elevada., 23 de ellos pertenecían al grupo de hipertensos. La presión del grupo sintomático, media 157.8/99.39, fue significativamente más elevada que la del grupo asintomático, 131.35/84.07 ( $p=0.001$  para la sistólica y  $p=0.001$  para la diastólica). Sin embargo, al comparar las presiones por separado entre los hipertensos sintomáticos y los no sintomáticos ( $n=29$ ) no se halló diferencia significativa (168.2/105.6 y 158.2/95.1 respectivamente,  $p=ns$  para la presión sistólica y diastólica). Tampoco se halló diferencia al comparar las presiones de los no hipertensos sintomáticos y no sintomáticos (134.0/85.3 y 125.1/81.5 respectivamente,  $p=ns$  para ambas presiones). Dado que el

grupo de hipertensos aportó la mayor parte de pacientes sintomáticos, concluimos que los pacientes que dicen sentir la presión elevada son con más frecuencia hipertensos, aunque su presión no difiere de la media una vez que se corrige para su condición de hipertensos.

**269. Implicancia funcional de los receptores  $\beta$  adrenérgicos en la aurícula aislada de rata.**

Agustina Vila Echague, E. Borda y Leonor Sterin-Borda.

CEFYBO-CONICET. Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina y Odontología, UBA, Buenos Aires.

Es conocido que los receptores  $\beta$  adrenérgicos ( $\beta$ B) están involucrados en el ritmo y el automatismo cardíaco, funciones atribuidas exclusivamente a los  $\beta$ B<sub>1</sub>. Sin embargo en aurículas humanas estimuladas eléctricamente se observó que los  $\beta$ B<sub>2</sub> también modulaban la frecuencia (F). En este trabajo, usando agonistas y bloqueantes específicos y como modelo la aurícula aislada de rata (AAR) latiendo espontáneamente en KRB, se estudió la participación funcional de los  $\beta$ B<sub>2</sub> en la función cardíaca. Se observó que el salbutamol (S) incrementó en forma concentración dependiente ( $3 \times 10^{-9}$ M a  $5 \times 10^{-6}$ M) la tensión (T) máxima: +43% ± 4, (n=7) y la F máxima: +55% ± 5, (n=7). El bloqueo específico de los  $\beta$ B<sub>2</sub> con butoxamina (B) ( $10^{-7}$ M) desplazó la curva del agonista hacia la derecha tanto sobre la T como la F (ED50:S:  $4 \times 10^{-8}$ M; S+B:  $6 \times 10^{-7}$ M, n=7). Por su parte el bloqueo de la calcio/calmodulina con TFP ( $5 \times 10^{-6}$ M), de la óxido nítrico sintetasa (ONS) con L-NMMA ( $5 \times 10^{-6}$ M) y de PKC con staurosporina ( $10^{-9}$ M) atenuaron los efectos del agonista  $\beta$ , en ambos parámetros ( $p < 0.001$ ). S ( $5 \times 10^{-7}$ M) estimuló a la ONS (+39% ± 3) y traslocó a la PKC de membrana (pmol/min/mg prot): Basal:  $1.5 \pm 0.2$ , S:  $4.3 \pm 0.3$ , n=6 y la producción de AMPc (pmol/mg: Basal:  $0.73 \pm 0.04$ , S:  $4.6 \pm 0.3$ , n=7). Los resultados muestran la presencia de  $\beta$ B<sub>2</sub> funcionales en la AAR, los mismos están acoplados a sistemas de transducción de señales que involucran a la adenilato ciclase, PKC y ONS. Este hecho permite inferir que la funcionalidad de la AAR es modulada por  $\beta$ B<sub>2</sub> al igual que su homóloga humana haciendo de la primera un buen modelo para la extrapolación de los estudios fisiológicos en humanos.

**270. Señales de transducción involucradas en los efectos cronotrópicos positivos inducidos por la estimulación  $\beta$  adrenérgica en la aurícula aislada de rata.** Agustina Vila Echague, E. Borda, Graciela Cremaschi, Ana María Genaro y Leonor Sterin-Borda.

CEFYBO-CONICET. Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina y Odontología, UBA, Buenos Aires.

Es bien conocido que los agonistas  $\beta$  adrenérgicos ejercen efectos inotrópicos (ino)/cronotrópicos (crono) positivos en miocardio, asociados al aumento del contenido de Ca<sup>++</sup> intracelular y al incremento de AMPc. En este trabajo mostramos otras señales de transducción que estarían involucradas en los efectos crono positivos del Isoproterenol (Iso) sobre aurícula aislada de rata. Se observó que el Iso ejerció un crono positivo concentración dependiente desde  $5 \times 10^{-10}$ M: +15% ± 2% y a  $3 \times 10^{-7}$ M: +93% ± 5%, (n=6) ese efecto resultó atenuado por la inhibición de los caminos metabólicos implicados en la activación de la óxido nítrico sintetasa

(ONS) por L-NMMA ( $5 \times 10^{-6}$ M); Calcio/calmodulina por TFP ( $5 \times 10^{-6}$ M) y PKC por Staurosporina ( $5 \times 10^{-9}$ M) que atenuaron significativamente ( $p < 0.001$ ) los efectos crono del Iso. El Iso a concentraciones crono activó la ONS ( $3 \times 10^{-7}$ M: 68% ± 5%), (n=6) y traslocó PKC (Basal PKC membrana pmol/min/mg prot:  $1.7 \pm 0.4$  y Iso  $3 \times 10^{-7}$ M:  $7.9 \pm 0.5$ , n=6) y aumento la producción de AMPc (picomol/mg) (Basal:  $0.83 \pm 0.05$ , Iso  $3 \times 10^{-7}$ M:  $7.7 \pm 0.4$ , n=6). Por su parte la inhibición de la movilización de Ca<sup>++</sup> por verapamil y TFP bloquen los efectos del Iso sobre AMPc, PKC y ONS. Los resultados indican que en el efecto crono positivo del Iso participan la ONS y la fosforilación de PKC en conjunción con la adenilato ciclase, siendo la activación de estas enzimas calcio dependiente.

**271. Fibrilación auricular en la enfermedad de Chagas.** Rubén Storino, Sergio Auger, María Inés Urrutia, Jorge González Zuelgaray.

Centro de Enfermedad de Chagas, Fundación INCALP, La Plata.

**Objetivos:** Evaluar las características de la cardiopatía que presentan los pacientes (P) chagásicos crónicos con fibrilación auricular (FA) así como su tratamiento y evolución. **Material y Métodos:** Sobre un total de 705 P evaluados en consultorio de enfermedad de Chagas, se seleccionaron aquellos que por electrocardiografía y Holter de 24 Hs. presentaban FA (permanente o paroxística). Se incluyeron 49 P (7%) y se les realizó Rx de tórax y ecocardiograma 2D y modo M. Durante el seguimiento de 3 años se evaluó sintomatología, incidencia de dilatación auricular y ventricular izquierda (AI y VI), trastornos de conducción y arritmias asociadas, evolución y mortalidad. **Método estadístico:** Chi2. **Resultados:** Sobre 49 P con FA, el 55% eran hombres con una edad promedio de 57 años. Fueron sintomáticos 47/49 (96%)  $p < 0.001$ , predominando la disnea (67%), palpitaciones (61%) y mareos (24%). Presentaban FA permanente 42 P (86%) y paroxística 7 P (14%), y tenían diámetros AI y VI aumentados el 96%. Los trastornos de conducción asociados se observaron en 33/49 P (67%)  $p < 0.05$ , y presentaron arritmia ventricular 41/49 P (84%)  $p < 0.05$ . Los antiarrítmicos más utilizados fueron: amiodarona (84%), digital (53%) y sotalol (2%). La anticoagulación se utilizó en el 16% de los P (FA paroxística). Se observaron episodios embólicos en el 4% de los casos y la mortalidad en 3 años fue de 14/49 P (28%), y sus causas fueron insuficiencia cardíaca (64%) y en forma súbita (36%). **Conclusiones:** 1). Se confirma la presencia de FA como una arritmia indicadora de mal pronóstico, asociada a la miocardiopatía chagásica dilatada con trastornos de conducción y arritmias ventriculares graves. 2). La elevada mortalidad observada en el seguimiento (28%) estaría relacionada con la mala función ventricular. 3). La baja incidencia de episodios embólicos a pesar de la baja proporción de pacientes anticoagulados (debido a las condiciones socio-culturales y económicas) deberá ser motivo de futuras investigaciones.

**272. Situación laboral en la enfermedad de Chagas.** Sergio Auger, Rubén Storino, María Inés Urrutia, Miguel Jörg.

Centro de Enfermedad de Chagas, Fundación INCALP de La Plata.

**Objetivos:** Evaluar las condiciones laborales del paciente

chagásico, índices de ocupación, subocupación y desocupación en relación a la serología, y a la cardiopatía y en comparación con la población general. Material y Métodos: Se consideraron 705 pacientes chagásicos (PCh). De acuerdo a la normatización de la Organización Internacional del Trabajo se analizó población económicamente activa (PEA) mayor de 16 años, población económicamente inactiva (PEI), y dentro de la PEA, los ocupados (O) -en blanco y en negro-, los subocupados (S) -visibles e invisibles, y los desocupados (D). Los hallazgos se compararon con los mismos parámetros respecto de la población general (PG) en la Argentina. Además los distintos ítems laborales se evaluaron de acuerdo a la clasificación de los enfermos chagásicos en GI: serología sin cardiopatía, GII: cardiopatía sin dilatación, GIII: cardiopatía dilatada. Método estadístico: Test de las diferencias de proporciones. Resultados: En las PCh, la PEA era 46%, con O en el 21% (en blanco 8,6% y en negro 12,4%), S en el 49,5% (visibles 11,5%, invisibles 38%), D en el 29% de los casos; mientras que la PEI era 54%. La suma de D + S fue del 78,5%. Con respecto a la PG, se observó diferencia estadísticamente significativa en los O ( $p < 0,05$ ), existiendo también una tendencia mayor (aunque no significativa) en los S y D chagásicos. Con respecto a los diferentes grupos de PCh, el 47% de los D no tenían cardiopatía, 36% presentaban cardiopatía controlable y solo el 17% restante tenía cardiopatía dilatada leve. Conclusiones: 1). Se evidenció un alto índice de PCh S y D mayor que la PG, 2). Los PCh O fueron significativamente menores que la PG por lo que la serología positiva sería el factor limitante al ingreso laboral, 3). Los elevados índices de D no tuvieron relación con la presencia de cardiopatía.

**273. Participación de la PGE<sub>2</sub> y óxido nítrico (ON) en los efectos muscarínicos cardíacos por**

**autoanticuerpos en el Síndrome de Sjögren.** Juan José Camusso, C Pérez Leirós, L Sterin-Borda, G Gorelik, O Hubsher, E Borda.

*CEFYBO-CONICET, Cátedra de Farmacología FOUBA y CEMIC; Buenos Aires.*

En trabajos previos demostramos una prevalencia del 98% de autoanticuerpos muscarínicos (auAcM) en el bloqueo cardíaco congénito completo (BCCC) asociado al Síndrome de Sjögren primario (SSp). En este trabajo se investigó si el ON y la PGE2 son mediadores de las alteraciones contráctiles (dF/dt, g/s) que los auAcM ejercen sobre el miocardio neonatal de rata. Se observó que los auAcM inhiben en forma concentración dependiente el dF/dt (Emax %: -45±3, n=25;  $5 \times 10^{-9}$ M); efecto que fue prevenido por atropina (ATROP), indometacina (INDO), ASA, L-NMMA y revertido este último por L-arginina. Asimismo, los auAcM estimularon la actividad de óxido nítrico sintasa (ONS) (CPM/mg: Basal 716±16, auAcM 1111±22, n=12), la producción de GMPc (% respecto al basal: auAcM 39±4, n=5) y de PGE2 (pg/mg tejido: Basal 34±2, auAcM 55±3, n=10). ATROP, L-NMMA, INDO y ASA inhibieron dichos efectos. A su vez, la PGE2 exógena ( $2 \times 10^{-9}$ M) revirtió la acción de los inhibidores de la ciclooxigenasa (COX) sobre la ONS y potenció el aumento de GMPc por los auAcM. Por otra parte, los auAcM inhibieron la unión del radioligando (<sup>3</sup>H-QNB) a los receptores muscarínicos cardíacos neonatales. Los resultados indican que en el suero de pacientes con SSp que tiene hijos con BCCC existen auAcM capaces de modular la contractilidad de aurículas neonatales a través de la activación bidireccional de la ONS y de la COX con incrementos en los niveles de GMPc. Este nucleótido tendría una importante participación en los efectos inotrópicos negativos de los auAcM.

## Interdisciplinaria

- 274. La IgA de pacientes hemofílicos HIV+ desencadena señales de transducción a la activación muscarínica colinérgica intestinal.** M.E. Sales, M.M. E. de Bracco, E.Borda.

*CEFYBO, CONICET, Cátedra de Farmacología - FOUBA. IIHEMA. Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.*

El presente trabajo demuestra que la IgA proveniente del suero de pacientes hemofílicos HIV+, reconoce estructuras antigenicas en las microvellosidades intestinales, pues la IgA-HIV+ interacciona con receptores colinérgicos muscarínicos (RCM) desplazando la unión específica del antagonista colinérgico tritado QNB en forma no competitiva y reconoce una fracción proteica en ensayos de immunoblotting que coincide con la de los RCM marcados con propil bencil colina. De aquella interacción surgen señales de transducción intracelulares correspondientes a la activación de los RCM. Estas son la disminución de los niveles de AMPc, incremento en la producción de inositoles fosfato, incremento en la actividad de proteína quinasa C que regula negativamente a la sintasa de óxido nítrico (NO) e incremento en la formación de GMPc. También observamos un aumento en la actividad de fosfolipasa A<sub>2</sub> que induce la producción y liberación de PGE<sub>2</sub>. A través de este efecto la IgA-HIV+ podría ejercer inmunosupresión local incrementada por el descenso en la síntesis de productos tóxicos derivados del metabolismo del nitrógeno, favoreciendo el crecimiento de patógenos intestinales. Por otra parte podría aumentar la motilidad intestinal con pérdida de electrolitos y fluidos que agravarían la disfunción intestinal en el SIDA.

- 275. Asociación entre el gen del receptor de TRH y la hipertensión arterial esencial (HTA).** S.I. Garcia, P.I. Porto, T.Kirszner, R. Simsolo, A.L. Alvarez, Y. Plotquin, J. Lajfer, B. Grunfeld, D. Shaurli, C. Gonzalez, S. Finkelman, CJ Pirola.

*IDIM A Lanari, Dpto Farmacol., Fac. Med., UBA; Serv. Hipert., Htal Zubizarreta; FEHYLN, Htal de Niños R. Gutierrez; Buenos Aires.*

La TRH participa en el control central de la función cardiovascular en la rata normal y de la patogénesis de la hipertensión espontánea de este animal donde existe un aumento de los receptores de TRH a nivel hipotalámico. En el presente trabajo testeamos la hipótesis de que ciertas variantes moleculares del gen del TRHR están asociadas a hipertensión arterial esencial y/o sus complicaciones. Estudiamos el polimorfismo de un VNTR de dinucleótidos TG presente en el promotor mediante PCR y PAGE electroforesis en 85 sujetos con HTA (H, edad: 59±7 años, 60 mujeres) y 57 normotensos (N, edad: 55±9, 37 mujeres). Se observaron dos tipos de alelos de aprox. 120 bp (C) y 200 bp (L). La frecuencia (%) de estos, que están en equilibrio de Hardy Weinberg, difirió significativamente ( $p<0.01$ , Chi<sup>2</sup>) entre ambos grupos (H/N, CC:65/40, LC:34/54, LL1/6). En los H existió una correlación positiva entre el número de antihipertensivos administrados y el de alelos C (Spearman R: 0.26,  $p<0.05$ ). En pobla-

ción total, el BMI está correlacionado al número de alelos C (Spearman R: 0.21,  $p<0.03$ ). Otros fenotipos intermedios estudiados no se relacionaron con el genotipo C/L. En conclusión, se describe por primera vez una asociación positiva del gen del TRHR con la hipertensión esencial y algunas de sus alteraciones metabólicas asociadas. La mayor prevalencia de alelos C se observa también en adolescentes con antecedentes de HTA.

- 276. Citogenética, hibridización in situ y sitios frágiles en neoplasias mieloideas.** S. Acevedo, A. Fundia, M.V. Castuma, I. Larripa.

*Depto de Genética, IIHema, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.*

En el presente trabajo, se evaluó el cariotipo mediante estudios citogenéticos y de hibridización in situ (FISH) así como la expresión de sitios frágiles (SF) en 65 pacientes con leucemia mieloblástica aguda (LMA) y 38 con mielodisplasias (SMD). El estudio fue realizado en cultivo de médula ósea (48Hs) y sangre periférica (72Hs). El 74% de los casos con LMA presentó algún tipo de alteración cromosómica siendo la numérica más frecuente la trisomía 8, y las estructurales: t(8;21), t(15;17), t(9;22), inv(16), del(7q) y del(11q); siendo de mayor especificidad la t(15;17) y t(9;22) en M3 y M1 respectivamente. El 66% de los SMD presentó aberraciones clonales tales como: +8, -7, del(5q), del(7q) y del(12p). Se encontró una fuerte asociación entre del(7q) y el subtipo AREB. Por FISH se identificaron y cuantificaron los clones neoplásicos. Los niveles de alteraciones inducidas con BUDR en LMA presentaron diferencias significativas ( $p<0.05$ ) respecto de controles. En LMA se definieron 11SF ausentes en los controles que presentaron una correlación significativa ( $p<0.001$ ) con puntos de ruptura asociados a LMA. En SMD se encontraron 2 SF propios de los pacientes coincidentes con puntos críticos de esta patología. Nuestros datos indicarían que la expresión de ciertos SF estaría relacionada con el origen de los rearrreglos cromosómicos asociados a estas patologías.

- 277. Expresión diferencial de proteína quinasa C y óxido nítrico sintasa en linfocitos T tumorales. Implicancia en la etiología de los procesos neoplásicos.** Ana M. Genaro y Graciela A. Cremaschi.

*CEFYBO, CONICET; Cád. Radioquímica, Fac. de Farm. y Biología, y Cád. de Farmacología, Fac. de Odontología, UBA, Buenos Aires.*

En este trabajo estudiamos las actividades enzimáticas de proteína quinasa C (PKC) y de óxido nítrico sintasa (NOS), en linfocitos T tumorales (LT) y normales (LN) durante distintas etapas de la activación celular. Encontramos que en LT había una actividad significativamente aumentada y traslocada de PKC (valores citosol/membrana, pmol/min/10<sup>7</sup> cel: LN: 12.7 ± 0.8 / 2.3 ± 0.3 vs. LT: 4.0 ± 0.4 / 26.7 ± 1.8, n=5) y una elevada expresión de la isoenzima  $\zeta$ . Sin embargo, LN expresaron cantidades escasamente detectables de dicha isoenzima, los que no aumentaron cuando la proliferación y diferenciación de células T fue inducida in

*vitro* por estimulación con mitógenos o *in vivo* por inmunización alógeneica. Además, los LT, a diferencia de los LN activados, mostraron una importante actividad de NOS ( $92.0 \pm 5.3$  pmol /  $10^7$  cel,  $p \leq 0.001$ ). Comprobamos que el tratamiento de las LT tanto con un inhibidor de PKC como con un inhibidor de NOS, disminuyó la producción de óxido nítrico (NO) ( $45.3 \pm 3.7$  pmol /  $10^7$  cel,  $p \leq 0.05$ ) y la proliferación celular. Estos resultados indicarían que esta isoenzima atípica de PKC y su asociación con la aumentada producción de NO, podrían participar en los pasos que llevan a la transformación maligna linfocitaria. Estos hallazgos serían de utilidad en el desarrollo de nuevos caminos terapéuticos para el tratamiento de procesos neoplásicos.

- 278. Alteraciones catecolaminérgicas periféricas en adolescentes con poliquistosis ovárica (PCO).** Cecilia García Rudaz, Inés Armando, Gloria Levin, María Eugenia Escobar y Marta Barontini.

*Centro de Investigaciones Endocrinológicas. Htal de Niños R. Gutiérrez. Buenos Aires.*

El síndrome de PCO es una de las patologías más frecuentes que afecta a mujeres en edad reproductiva. Existen evidencias que sugieren que el sistema nervioso simpático (SNS) estaría involucrado en la patogenia del mismo. Este trabajo evalúa la actividad del SNS a través de determinaciones neuroquímicas en pacientes adolescentes con PCO (n:14; EC X:16.9 a) y en controles eumenorreicas (n:9; EC X:16.7 a). Se determinaron los niveles basales de testosterona (T), androstenodiona (A), estrona (E<sub>1</sub>), estradiol (E<sub>2</sub>) por RIA y SHBG por unión a DHT. En respuesta a GnRH se determinaron las concentraciones plasmáticas de LH y FSH por RIA, Dopa, noradrenalina (NA), adrenalina, dopamina total y dihidroxifenilglicol (DHPG) por HPLC-EC ó por método radioenzimático, como también, las concentraciones urinarias de Dopa, catecolaminas y metabolitos de las catecolaminas: DHPG, ácido vamillín mandélico (AVM), metoxihidroxifenilglicol (MHPG), ácido homovanilílico (HVA), metanefrina (MN) y normetanefrina (NMN) por HPLC-EC. Los niveles de LH, T, A, E<sub>1</sub> y la relación LH/FSH fueron significativamente mayores ( $p < 0.01$ ) en las pacientes con PCO. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de E<sub>2</sub>, FSH, así como tampoco en los de Dopa y catecolaminas plasmáticas basales ni post GnRH, ni en los niveles urinarios de catecolaminas, AVM, HVA y MHPG. En las pacientes se encontró una disminución significativa del DHPG plasmático ( $712 \pm 45$  vs  $1364 \pm 168$  pg/ml,  $p < 0.01$ ), del DHPG urinario ( $78 \pm 4$  vs  $124 \pm 15$   $\mu$ g/24 hs,  $p < 0.01$ ) y un incremento significativo en la NMN urinaria ( $220 \pm 23$  vs  $147 \pm 19$   $\mu$ g/24 hs,  $p < 0.05$ ). Estos resultados demuestran una alteración catecolaminérgica periférica en las adolescentes con PCO que puede deberse a una disminución en la captación neuronal de NA o en su deaminación. El hecho que las adolescentes con PCO presenten las mismas alteraciones endocrinológicas que las adultas apoya el comienzo peripuberal del síndrome.

- 279. Diagnóstico precoz de neoplasia endocrina múltiple tipo 2 (MEN 2) por la detección de portadores de mutaciones en el proto-oncogén RET.** Gabriela Sansó, H.M.Domené, Sonia Iorcansky, Marta Barontini.

*Grupo Colaborativo para el Estudio de MEN: Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE), Hospi-*

*tal de Niños "R. Gutiérrez", Servicio de Endocrinología, Hospital de Pediatría "J.P. Garraham", Buenos Aires.*

El MEN 2 es un síndrome hereditario autosómico dominante, en el cual mutaciones del RET dan origen a tres fenotipos diferentes: carcinoma medular de tiroides familiar (CMTF), MEN 2A y MEN 2B. La identificación de mutaciones en el proto-oncogén RET predice el desarrollo de la enfermedad antes de las evidencias clínicas y bioquímicas. En este trabajo se identificaron portadores del RET por caracterización de mutaciones en pacientes y sus familiares. Se estudiaron 2 familias con CMTF (5 y 6 miembros), 4 con MEN 2A (dos de 5, una de 4 y otra de 3 miembros) y 2 con MEN 2B (5 y 1 miembros). Se obtuvieron muestras de ADN de sangre, en todos los casos y de tejido de feocromocitoma y/o tejido tiroideo en los operados. Se utilizó PCR para amplificar los exones 10, 11 y 16 con oligonucleótidos específicos, realizándose secuenciación directa de los fragmentos. En las familias con CMTF y con MEN 2A se encontraron mutaciones en el codón 634 del exón 11 en 16 sujetos, detectándose 9 casos con la mutación TGC → CGC (cisteína a arginina), 3 con TGC → TAC (cisteína a tirosina) y 4 con TGC → TTC (cisteína a fenilalanina). En los pacientes con MEN 2B se encontró una mutación en el codón 918 del exón 16 ATG → ACG (metionina a treonina). En tejido tumoral se detectó la misma mutación que en sangre periférica. El diagnóstico de MEN 2 fue confirmado en los 8 pacientes y detectado en 10 familiares. En los 5 portadores tiroidectomizados se encontró: hiperplasia de células C o microcarcinoma in situ en 2 niños (9 y 12 años) y CMT en 3 adultos. La detección temprana de mutaciones del RET, especialmente en familiares, seguida por tiroidectomía total, podría prevenir el desarrollo de CMT, modificando el desenlace fatal que ocurre cuando es diagnosticado tarde.

- 280. Terapia génica de tumores mediante el uso de genes suicidas.** \*M.Berenstein, \*S.Adris, \*F.Ledda, +C. Wolfmann, +J.Medina, #A.Bravo, \*J.Mordoh, ♀Y.Chernajovsky, \*O.Podhajcer.

\*IIB- Fundación Campomar, #Hosp. E. Perón, +IBC, Fac.Medicina, UBA, ♀Kennedy Institute of Rheumatology, London, UK.

Células tumorales transducidas con vectores retrovirales, portando el gen de la timidina kinasa del virus herpes simplex-1 (HSV-tk), convierten al ganciclovir (GCV) en un metabolito tóxico para células en división. La eficiencia de esta "terapia suicida", aumenta debido al "efecto bystander", que produce regresión de la masa tumoral aún cuando sólo una fracción de la misma haya sido modificada. En este trabajo se evaluó la efectividad del sistema en tres modelos tumorales distintos: un melanoma humano, uno murino, y un glioma de rata. *In vitro*, el efecto bystander sólo fue observado para células C6 de glioma. En ensayos *in vivo* a corto plazo, se observó inhibición del crecimiento tumoral en los tres modelos ( $p < 0.01$ ), luego del tratamiento con HSV-tk/GCV. A largo plazo, la terapia suicida suprimió el crecimiento del glioma en cerebro de ratas, inyectadas por estercotaxis con células C6; aumentando significativamente ( $p < 0.0001$ ) la sobrevida de animales tratados respecto del control. Las ratas sobrevivientes fueron capaces de rechazar un desafío con células parentales, implantadas en el hemisferio contralateral, indicando el desarrollo de una respuesta inmune de memoria. Por inmunohistoquímica se observó la presencia de un infiltrado inflamatorio masivo compuesto

por linfocitos T, macrófagos y polimorfonucleares. Estos resultados demuestran que el uso de genes suicidas puede ser una herramienta alternativa de gran importancia en el tratamiento de tumores de cerebro y metástasis cerebrales.

- 281. El perfil neuroendocrino específico es crítico para una correcta respuesta inmune T-dependiente.** Carolina Pérez Castro, M Paez Pereda, Elizabeth Keller, E Arzt.

*Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, FCEyN, Dep. de Ciencias Biológicas, UBA, Buenos Aires.*

Existe una relación funcional entre los sistemas neuroendocrino e inmune. Examinamos el rol de los cambios neuroendocrinos, particularmente hormona liberadora de tirotrofina (TRH) y prolactina (PRL), durante el curso de la respuesta inmune T-dependiente. En ratas inmunizadas ip con Eritrocitos de Carnero (SRBC, antígeno T-dependiente), se observó: a) un incremento del mRNA de TRH hipotalámica entre las 4 y 24h post-inmunización (ej: SRBC vs. salina: 4h, 2,8 x), en contraste a una disminución del mRNA de TRH observado por tratamiento con antígenos T-independientes (ej: LPS vs. salina: 4h, 1,6 x); b) un incremento del mRNA del receptor de TRH y de los niveles de PRL plasmática sin observarse cambios, en los niveles plasmáticos de hormona de crecimiento y tirotrofina. La inyección intracerebroventricular (icv) en ratas conscientes y en movimiento de oligonucleótidos antisentido al mRNA de TRH produjo: a) una inhibición en la producción de anticuerpos anti-SRBC [ELISA 7 días: Ig(M+G): TRH sentido vs. TRH-antisentido: 384 ± 27 vs. 193 ± 22 (n=11); p<0,001, ANOVA con test de Scheffé's]; b) una incapacidad en producir el pico de liberación de PRL luego de la inmunización (12 h post-inmunización, TRH-sentido vs. TRH-antisentido: 8,3 ± 1,4 vs. 2,2 ± 0,5 (n=6), p<0,01, ANOVA con test de Scheffé's); c) una disminución del mRNA de TRH hipotalámica (TRH-sentido vs. TRH-antisentido: 12 h, 1,7 x). Estos estudios demuestran que un antígeno T-dependiente requiere de una activación temprana de TRH y PRL, instrumental para montar una respuesta adecuada, en contraste a la inhibición de estas inducida por antígenos T-independientes.

- 282. Detección de autoanticuerpos antiglutamato decarboxilasa en 65 pacientes con diabetes mellitus insulino dependiente, mediante enzimoinmunoensayos.** Silvina N. Valdez<sup>1</sup>, Mariana L. Papouchado<sup>1</sup>, M. Ermácora<sup>2,3</sup> y E Poskus<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup> Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. <sup>2</sup> Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. <sup>3</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Buenos Aires.

La mayoría de los pacientes con Diabetes Mellitus Insulino Dependiente (DMID) presentan autoanticuerpos anti glutamato decarboxilasa 65 (GADA) varios años antes de la aparición de la enfermedad. Se desarrollaron cuatro protocolos de enzimoinmunoensayos (ELISA) para la detección de GADA usando la proteína de fusión tiorredoxina-GAD (TrxGAD) recombinante, producida en *E. coli*. Estas variantes fueron: a)

ELISAs de captura (c-ELISA) empleando Trx-GAD o Trx-GAD-biotina inmovilizadas indirectamente por un proceso no adsorptivo y b) ELISAs con preincubación antígeno-anticuerpo (p-ELISA) en los cuales los GADA se hicieron reaccionar con Trx-GAD o Trx-GAD-biotina en solución, y el antígeno libre remanente se determinó mediante un ELISA convencional. Los valores de especificidad y sensibilidad obtenidos en 42 pacientes con DMID recientemente diagnosticados y 30 normales fueron respectivamente: ensayo de unión de radioligando o RBA (método de referencia): 97 y 79%, c-ELISA empleando Trx-GAD: 100 y 36%, c-ELISA empleando Trx-GAD-biotina: 97 y 50%, p-ELISA empleando Trx-GAD: 97 y 74% y p-ELISA empleando Trx-GAD-biotina: 93 y 79%. Estos resultados muestran que los p-ELISAs son sistemas accesibles que pueden reemplazar al RBA en la detección masiva de GADA en sueros humanos.

- 283. Una amplia variedad de tejidos con diferentes funciones comparten una fosfoproteína novel intermedia en la liberación de ácido araquidónico.** Paula Maloberti, Carla V. Finkelstein, Isabel Neuman, Cristina Paz, Angela R. Solano, E. J. Podestá

*Podestá. Dto. de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina. UBA. Buenos Aires.*

p43 es una fosfoproteína citosólica novel intermedia obligatoria en la acción hormonal sobre tejidos esteroidogénicos a través de la liberación de ácido araquidónico (aa). En el presente trabajo, caracterizamos a p43 como miembro de una familia novel de fosfoproteínas descriptas en una amplia variedad de otros tejidos de diferentes especies. PCR y Southern blot sobre ADN genómico de rata y humano utilizando cebadores específicos y sonda de p43 reveló la existencia de más de un fragmento de amplificación sugiriendo la presencia de más de un gen para p43 en ambas especies. Resultados similares, se obtuvieron al realizar la técnica de chromosome walking y Shoutern blot sobre ADN genómico. Las secuencias de ADNc de p43 en las distintas especies presentó una homología del 80% en la región codificante además de regiones únicas características de cada especie. Por análisis de RT-PCR y Northern blot se determinó la presencia del mensajero en tejidos de la especie humana y de ratón. Bazo, Hígado, Cerebro, Pulmón, Placenta y Adrenal presentaron un único transcripto (3,3 kb) mientras que Riñón, Corazón, Ovario y Testículo presentaron dos de 2,5 y 3,3 kb. En estos tejidos p43 se presenta como una fosfoproteína con varias isoformas regulables hormonalmente y en tejidos como corazón regularía también la liberación de aa. Estos resultados confirman la presencia de una familia novel de fosfoproteínas intermedias en la regulación hormonal de la liberación de aa.

- 284. ¿Es el cobayo un modelo profeno-animal válido para el estudio de la inversión quiral (IQ) en humanos?** MF. San Martín, L. Igarza, F. Fogel, A. Soraci, O. Tapia

*Depto de Fisiopatología. Facultad de Cs. Vet. UNCPBA.. Tandil.*

La IQ es un proceso metabólico particular de ciertos profenos, el cual permite la transformación selectiva y unidireccional del enantiómero R (-) farmacológicamente inactivo, al enantiómero

S(+), activo. La magnitud de tal inversión varía de manera considerable entre los diferentes profenos y en distintas especies animales, incluido el hombre. Es importante conocer tal magnitud al momento de establecer un régimen terapéutico adecuado. La IQ de senoprofeno (FPP) en humanos es 60%. No se ha hallado aún un modelo animal metabólico cuyos datos sean extrapolables al hombre. Para tal fin 10 cobayos adultos fueron tratados con R(-)

FPP y S(+) FPP en dos grupos por separado, previa anestesia y canalización i.v. El muestreo se hizo durante 2 hs. por vía i.v. y las concentraciones plasmáticas de (R) - y (S) - FPP se midieron por HPLC, previa derivatización de las muestras. La IQ de FPP en cobayos fue de 60,4% con un CV= 6,1%. En base a los datos obtenidos, el cobayo sería un modelo metabólico adecuado para el estudio y desarrollo de FPF destinado al uso humano.

## Neurociencias II

- 285. Efecto de los agonistas D1 y D2 sobre la actividad neuronal unitaria de la sustancia negra reticulada en ratas 6-OHDA.** Tseng K.Y., Riquelme L.A., Pazo J.H. y Murer M.G.

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

La activación sinérgica de receptores D1-D2 estriatales es necesaria para producir una respuesta en la actividad electrofisiológica de la sustancia negra reticulada (SNr) en ratas normales [SAIC '95; Medicina 55: 558]. En ratas 6-OHDA, encontramos un aumento de las unidades de la SNr que responden a la apomorfina (agonista D1-D2). Objetivo: evaluar la actividad inducida por microinyección de SKF38393 (SKF 10nmoles/0.5ml) y de Quinpirole (QUIN 10nmoles/0.5μl) intraestriatal ipsilateral, sobre la actividad neuronal unitaria de la SNr en ratas 6OHDA. Los parámetros analizados fueron: frecuencia promedio (FP), intervalo entrespigas con su coeficiente de variación (CV) y el autocorrelograma. Resultados: La microinyección de SKF (n=16) y QUIN (n=9) produjo respuestas en un 68.7 % y 77.7 % respectivamente. En las ratas normales: 23.1% (n=13) y 16.7% (n=12) [X<sup>2</sup> p<0.01, gl: 1]. La incidencia de respuestas fue: SKF 54.6 % excitatoria, 27.2 % inhibitoria, 18.2 % bifásica; y QUIN 14.3 % excitatoria, 57.1 % inhibitoria, 28.6 % bifásica [X<sup>2</sup> p<0.001, gl: 2]. Conclusión: La lesión con 6OHDA produce un aumento de las unidades neuronales que responden al SKF y al QUIN en forma independiente, mientras que en las ratas normales se necesita la interacción sinérgica D1-D2. Hay una mayor incidencia de respuestas excitatorias con SKF e inhibitorias con QUIN.

- 286. Perfiles acídicos (PA) del líquido cefalorraquídeo (LCR) en pacientes con distintas Enfermedades Metabólicas Hereditarias (EMH).** A. Latini, G. Civallero; R. Kremer

Cemeco, Cátedra Clínica Pediátrica, Fac. Cs. Médicas UNCBE, Córdoba.

Se ha demostrado que determinados ácidos del LCR son responsables de alteraciones neurológicas en varias EMH y correlacionarlos con el defecto genético. Objetivos: Caracterizar los PA del LCR en EMH y correlacionarlos con el defecto genético. Material: Seis pacientes (P) con definidas EMH y compromiso neurológico. P1: Deficiencia (D) en aspartoacilasa; P2: D en Glutaril-CoA dehidrogenasa; P3: D en Citocromo C oxidasa; P4: Síndrome de Lowe; P5: D en Succinato dehidrogenasa; P6: Gangliosidosis GM2 tipo II. Método: Cromatografía Gaseosa. Resultados: Con respecto a la  $x \pm DE$  de 70 controles se observó incremento de los siguientes ácidos; P1: Nacetilaspartato (NAA), P2: glutarato (glu), P3: lactato (L), piroglutamato (Pg), 3OHbutirato (3OHB), metilgluconato (MG) y piruvato (Pir); P4: L, Pg, 3OHB y MG; P5: 2O Hisovalerato y MG y P6: L, Pir, Pg, 3OHB, glu, succinato y ácidos grasos (C 16:0, 18:0 y 18:1). Discusión: El NAA en P1 y el glu en P2 se mantienen como causales de la neurodegeneración espontánea y excitotoxicidad a través de los receptores de glutamato respectivamente. Los PA de P3 y P4 son consistentes con una Mitocondriopatía, nuevo concepto para el S de Lowe. El MG de P5 se muestra como metabolito no específico de daño del SNC,

considerado hasta aquí como un epifenómeno. El PA de P6 es inédito en una EMH lisosomal; el atesoramiento del GM2 podría ejercer citotoxicidad por el incremento del C18:0, su principal ác. graso. El estudio de PA del LCR dará mejor comprensión sobre la patogenia de la neurodegeneración en las EMH.

- 287. Implantes de noradrenalina restituyen la producción de triiodotironina en grasa parda simpatectomizada.** MA. Pavía, D. Hofer, R.S Zaninovich, K. Hagemüller, A.A. Zaninovich.

CONICET, Hospital de Clínicas, Buenos Aires e Inst. de Patología Experim., Univ. de Graz, Austria.

Más del 95% de la noradrenalina (NA) del tejido adiposo pardo (BAT) deriva de las terminaciones nerviosas simpáticas. En ratas con simpatectomía (Sx) del BAT, la NA es casi indetectable, y con ello la conversión de tiroxina (T<sub>4</sub>) a triiodotironina (T<sub>3</sub>) desciende marcadamente, afectando la termogénesis de ese tejido. Se estudiaron ratas Wistar de 250 g de peso, se hizo SX del BAT y a un grupo de ratas de les implantó, s.c., cápsulas conteniendo 5 mg de NA de liberación lenta. Mitad de las ratas fueron colocadas a 4°C durante 24 h. Luego de ello fueron sacrificadas y se extrajo el BAT, se homogeneizó, se separó en aliquotas y se agregó a cada una 0.5 uCi de <sup>125</sup>I-T<sub>4</sub> y 10 mM de ditioltreitol. Se incubó durante 60 min a 37°C y luego se efectuó cromatografía en papel. RESULTADOS. Ratones a 22°C: Las ratas sham (n=8) deiodinizaron 33 ± 10 (DS)% de <sup>125</sup>I-T<sub>4</sub>, con 17% de T<sub>3</sub> y el resto I. Grupo Sx (n=8) deiodinizó el 10 ± 4 % de <sup>125</sup>I-T<sub>4</sub> (p < 0.01 versus sham); grupo Sx+NA (n=11) deiodinizó 95 ± 10 % de <sup>125</sup>I-T<sub>4</sub> (p < 0.01 vs grupo Sx). Ratones a 4°C: ratas sham (n=8) deiodinizaron 96 ± 27 % de T<sub>4</sub>; grupo Sx (n=9) 25 ± 15 % (p < 0.01); grupo Sx+NA (n=11) 95 ± 10% (p < 0.01 versus grupo Sx). La concentración de NA en BAT en ratas Sx fue de 90 ± 17 ng/g de tejido; en Sx+NA fue de 299 ± 30 ng/g (p < 0.01). CONCLUSIÓN: Los implantes de NA exógena restauraron la actividad de la 5'-deiodinasa del BAT a niveles normales.

- 288. Efecto del glutamato sobre la liberación de GABA desde el lóbulo neurointermedio de ratas hembras.** M. Pampillo, A. De Laurentiis, D. Pisera, M. del C. Díaz, B. Duvalanski, A. Seilicovich, M. Lasaga.

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

Los aminoácidos excitatorios modifican la liberación de prolactina y LH. El lóbulo neurointermedio (LNI) de la hipófisis juega un papel esencial en la regulación de la secreción adenohipofisaria. Considerando que el GABA afecta dicha secreción, investigamos el efecto del glutamato y sus agonistas sobre la liberación de GABA desde LNI de ratas hembras en diestro (intactas), ovariectomizadas (OVX) y OVX estrogenizadas. Glutamato (100 μM) estimuló la liberación de GABA evocada por K<sup>+</sup> en todos los grupos estudiados. (Intactas: 1.51 ± 0.11 nmol/l

mg prot., Glut: 1.96 ± 0.15; OVX: 0.45 ± 0.10, Glut: 1.20 ± 0.09; E2: 1.11 ± 0.08, E2 + Glut: 1.99 ± 0.03, p < 0.05, n = 5). N-metil-D-asparato (NMDA) (100 μM) también aumentó la liberación evocada de GABA desde el LNI, efecto que fue bloqueado por DAP5 (10 μM), un antagonista competitivo de los receptores NMDA, pero no por DNQX (10 μM), antagonista específico de los receptores no-NMDA. (Control: 2.27 ± 0.09, NMDA: 4.17 ± 0.07, NMDA + DAP5: 2.40 ± 0.04, NMDA + DNQX: 4.03 ± 0.03, p < 0.05, n = 5). El kainato (100 μM), un agonista no-NMDA, no modificó la liberación evocada de GABA. La actividad de la óxido nítrico sintasa en LNI no fue modificada por NMDA. En conclusión, el glutamato, actuando vía receptor NMDA, estimula la liberación de GABA desde LNI. Este efecto no estaría influenciado por el ambiente esteroideo y no sería mediado por el óxido nítrico.

- 289. Cambios en sincronía regional EEG durante una tarea de memoria de trabajo en sujetos normales.** A.A. Yorio, Irene Brauer, Claudia Marro, E.T. Segura.

Facultad de Psicología U.B.A e Instituto de Biología y Medicina Experimental C.O.N.I.C.E.T. Buenos Aires.

En el presente trabajo se estudian variaciones de potencia y coherencia regional de actividad alfa EEG durante la realización de una tarea en la que se combinan recuperación inmediata de series de dígitos con el reconocimiento de la reiteración de una serie a lo largo de la prueba. Participaron 8 sujetos sanos (edad 22.75 ± 5.94) a quienes se efectuó registro EEG durante una prueba de reproducción verbal de dígitos con repetición periódica de una serie. De las respuestas se computó la recuperación de la serie repetida (reconocimiento implícito) y se interrogó a los SS respecto del reconocimiento de la repetición. Sólo 5 SS reconocieron (implícita y explícita) la repetición de la serie. En ellos se observó disminución de la potencia de la banda alfa con aumento de potencia de uno de los picos alfa y de la coherencia regional de ese pico, especialmente entre derivaciones temporal, central y parietal ( $F=5.23$ ,  $P<0.01$ ). Se concluye que variaciones en la distribución topográfica, amplitud y sincronía de componentes de frecuencia dentro de la banda alfa se asocian con procesos cognitivos mnésicos exhibidos en la recuperación inmediata de series de dígitos, concomitante con el reconocimiento de una serie numérica de repetición periódica (prueba de Hebb, 1961).

- 290. Estrategias para el estudio morfológico y funcional de la cadena respiratoria aplicadas al diagnóstico de las Encefalomielopatías Mitocondriales (EMM).** Sandra R. Bacman, Inés Noher de Halac, Carola Grossi, Raquel Dodelson de Kremer.

Centro de Estudio de las Metabolopatías Congénitas (CEMECO). Fac. de Medicina. UNCba, Córdoba.

Introducción: Las Deficiencias (D) en la Fosforilación Oxidativa Mitocondrial (FOM) se asocian a numerosos cuadros clínicos. La complejidad bioquímica y molecular limita su estudio a centros especializados, de allí la constante búsqueda de procedimientos de alta aproximación identificatoria de los defectos en la FOM. Objetivos: 1) Caracterizar la capacidad funcional de la FOM en fibras musculares permeabilizadas con saponina. 2) Estudiar la histoenzimología en linfocitos de los complejos C-I, II,

IV y V de la FOM. Materiales: Biopsias musculares de 14 controles y 5 pacientes con D-FOM o EMM diagnosticadas en CEMECO. Métodos: 1) Saponificación de fibras musculares con glutamato/malato o succinato/rotentona e inhibidores y medición de ATP, 2) Histoenzimología en linfocitos con y sin inhibidores y evaluación de los C-I, II, IV y V. Resultados: 1) ATP (μmol/g tejido húm./30 min.): Controles: a) glu/mal: 5.34 ± 1.18 (n=10), b) succ/rotentona: 4.24 ± 0.81 (n=4), c) rot: 1.57 ± 0.60 (n=10). Pac. 1 (Enf. de Barth): a) 1.64 ± 0.36 (n=2), b) 2.45 ± 0.51 (n=2), Pac. 2 (S. de Lowe): a) 4.73 ± 0.62 (n=2), b) 3.24 ± 0.47 (n=2), Pac. 3 (D-FOM): a) 4.20 ± 0.38 (n=2), b) 2.20 ± 0.23 (n=2). 2) Linfocitos: se detectó actividad enzimática en 4 controles en C-I, II, IV y V y bloques parciales con inhibidores. Se observaron 2 pacientes con deficiencias en el C-IV (MELAS y D-FOM). Conclusiones: Estos nuevos métodos contribuirán al análisis de las EMM. Son accesibles, rápidos y no riesgosos. En forma preliminar no existiría una estricta correlación entre la valoración de la funcionalidad en fibras saponificadas y las D-FOM. En cambio, la histoenzimología en linfocitos guardaría mayor paralelismo. Estudios en otros pacientes se encuentran en desarrollo.

- 291. Cambio del patrón de descarga de las neuronas tipo-salvas de la sustancia negra reticulada de ratas 6-OHDA inducido por apomorfina.** K.Y. Tseng, L.A. Riquelme, J.H. Pazo y M.G. Murer.

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

En ratas normales, la actividad espontánea de la sustancia negra reticulada (SNr), presenta 3 patrones de descargas: regular, irregular con bajo y con alto coeficiente de variación (CV). En ratas 6-OHDA encontramos un cuarto patrón que fue denominado tipo-salvas. Objetivo: evaluar la actividad inducida por microinyección de Apomorfina (APO, 10nmoles/0.5μl) intraestriatal ipsilateral, sobre la actividad neuronal unitaria tipo-salvas (A) y no-salvas (B) de la SNr de ratas 6OHDA. Métodos: Fueron analizados: la frecuencia promedio (FP en Hz), el intervalo entre-espigas (ISI) con su CV y el autocorrelograma para definir la existencia de respuesta y para categorizar los diferentes patrones de descarga. Resultados: Se obtuvo respuesta: en el 100% de las neuronas del grupo A (n = 10) y 72.2 % en B (n = 11). El 50% del grupo A varió su patrón al tipo no-salvas, con disminución de su CV [p < 0.007]. En B no se encontró variación significativa del CV, independientemente del cambio de patrón dentro de las categorías no-salvas. Conclusión: Las neuronas del grupo A que cambiaron su patrón de descarga al tipo no-salvas, disminuyeron el coeficiente de variación del ISI.

- 292. Epilepsia y Porfiria.** Victoria Parera\*, M. Méndez\*, G. Ferreyra\*, M. Farrán\*, H. Muramatsu\*, S. Kochen\*\*, A. Batlle\*.

(\* ) CIPYD- CONICET, FCEyN-UBA. (\*\* ) Centro Municipal de Epilepsia (CME). Buenos Aires.

La porfiria aguda intermitente (PAI), producida por una disminución del 50% en la actividad de Deaminasa, se caracteriza por crisis de dolores abdominales, convulsiones y deterioro psíquico desencadenadas por agentes exógenos y/o endógenos. Según Kappas y col. (1983) existe una asociación del 10 al 20% entre la PAI y la epilepsia. Se realizó un análisis retrospectivo de los últimos 10 años

de los pacientes asistidos en el CIPYP con diagnóstico de PAI (101) y de los asistidos en el CME con diagnóstico de epilepsia (2253) determinándose la tasa de prevalencia específica de porfiria para la población epiléptica del CME (0,4/1000). Para establecer si existe alguna alteración del camino del hemo en pacientes epilépticos (n=96), sometidos a distintas terapias: carbamazepina (CBZ), valproato (VPA), fenobarbital (PB) y fentioína (PT), se determinaron el índice de porfirinas plasmáticas (IPP) y las actividades de δ-Aminolevúlico dehidrasa (ALA-D) y Deaminasa en sangre. En los 4 grupos la actividad de Deaminasa estaba significativamente disminuida ( $p<0.01$ ): CBZ (53,25±17,22); VPA (52,26±16,35); PB (47,42±16,41); PT 51,74±16,41); VN (77,54±13,33). El ALA-D de los tratados con CBZ (0,701±0,305) y PB (0,942±0,375) no presentó diferencias significativas con el VN (0,719±0,240) mientras que en los pacientes tratados con VPA (1,197±0,271) y con PT (1,135±0,377), la enzima aumentó significativamente respecto de los VN ( $p<0,01$ ). El IPP fue normal en todos los grupos (VN<1,30, λ 616). Estos resultados indican que la asociación porfiria-epilepsia es muy baja en nuestro país y que estas drogas deben evitarse en pacientes porfíricos.

- 293. Área 21: disminución de la densidad e incremento de la heterogeneidad de la distribución neuronal de cerebros esquizofrénicos.** E. Albanese, A. Merlo, E. Tornese, M. F. de Recondo, T. Mascitti, E. Gómez, H. Konopka, P. Albanese, A. Albanese.

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

Objetivo: comparar la densidad (D) y la heterogeneidad (H) de la distribución neuronal en el área 21 de la corteza cerebral de controles femeninos (C), n=3 y esquizofrénicas residuales -DSM IV- (E), n=3, diestros, apareados por edad. Se calculó la media (M) y el coeficiente de variación (C%) del número de neuronas de 25 columnas de cada hemisferio de cada cerebro. Usando las M y las C% se calcularon las D y las H de los grupos. Los resultados estadísticamente significativos son: las D (media +/- ES) de C y E en las capas I a III en el hemisferio derecho 33.52 +/- 0.28 y 29.41 +/- 0.14 ( $p<0.01$ ; ANOVA) y en el izquierdo 33.28 +/- 0.26 y 29.12 +/- 0.45 ( $p<0.01$ ; ANOVA). Las H correspondientes son significativamente mayores en los esquizofrénicos. En las capas IV a VI del hemisferio izquierdo la H es mayor en los esquizofrénicos. Se ha atribuido a los factores epigenéticos mayor influencia sobre las capas superficiales que son las que mostraron las mayores alteraciones.

- 294. Trastornos del ritmo cardíaco y respiratorio en siringobulbia y siringomielia.** Martín Nogués, H. Encabo, D. Saadia.

Departamento de Neurofisiología Clínica. Instituto de Investigaciones Neurológicas Dr. Raúl Carrea. FLENI, Buenos Aires.

Objetivo: Determinar la frecuencia y tipos de trastornos del control respiratorio y cardíaco, en pacientes con siringomielia y siringobulbia. Se estudiaron 20 pacientes con siringomielia (11 con siringobulbia y 9 con siringomielia sin compromiso bulbar). Se realizó polisomnografía, con registro de frecuencia cardíaca.

Se calculó el intervalo RR durante las alteraciones respiratorias. Los resultados de la variabilidad RR fueron comparados con los obtenidos en 6 sujetos control. Resultados: Frecuencia respiratoria media: 15.8±3.6 en pacientes con siringomielia y 14.5±5.3 en siringobulbia. Tres pacientes con siringobulbia presentaron apneas prolongadas durante la vigilia (17 a 44 seg de duración). La frecuencia cardíaca basal fue mayor en pacientes con siringobulbia que en sujetos sanos ( $p<0.01$ ). La frecuencia cardíaca permaneció sin variaciones aún durante apneas muy prolongadas con baja PO<sub>2</sub>. El cociente de variabilidad RR durante las apneas fue 1.00±0.06 en siringomielia, significativamente mayor que en controles ( $p<0.005$ ). Conclusiones: Las alteraciones en el ritmo respiratorio y cardíaco observadas en pacientes con siringobulbia con compromiso de los pares craneanos IX y X pueden ser debidas al daño de las neuronas respiratorias y cardíacas del bulbo.

- 295. Efecto del haloperidol (HAL) sobre señales intracelulares acopladas al receptor (R) α adrenérgico en corteza frontal de cerebro de rata.**

Tania G Borda, G Cremaschi, A M Genaro. CEFYBO-CONICET, Buenos Aires.

Previamente hemos descripto que el hal es capaz de interactuar con los R α, adrenérgico de corteza frontal incrementando la producción de fosfoinosítidos (PI). En el presente trabajo profundizamos el estudio de las señales intracelulares acopladas, especialmente la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) involucrada en diversas funciones neuronales. Observamos que el hal indujo una respuesta bifásica dependiendo de la concentración utilizada. A bajas concentraciones inhibió la actividad de NOS (pmoles/min x g tejido) mientras que a altas concentraciones (cc) estimuló la NOS (basal= 80±10; hal 10<sup>-9</sup>M= 59±8; hal 10<sup>-8</sup>M= 130±12; n=5). Se investigó la participación de proteína kinasa C (PKC) en este fenómeno. Observamos que el hal indujo translocación de PKC a todas las cc estudiadas siendo mayor para las cc mas bajas (relación % citosol/membrana: basal= 80/20; hal 10<sup>-9</sup>M= 57/43; hal 10<sup>-8</sup>M= 70/30; n=6). La staurosporina (inhibidor de PKC) revirtió el efecto inhibitorio mientras que la trifluoperazina (TFP) revirtió el efecto estimulatorio del hal. Se concluye que el hal a bajas cc induce una estimulación de PKC que lleva a una inhibición de la NOS; mientras que altas cc del hal y concomitantemente a un mayor incremento de Ca<sup>2+</sup> intracelular, produce una inhibición en la actividad de PKC que conduce a una mayor producción de NO. Estos resultados permitirían diferenciar los mecanismos que participan en la dosis terapéutica y tóxica de este neuroléptico.

- 296. Hiperexcitabilidad de motoneuronas espinales cervicales en siringomielia.** Martín Nogués, A. Rivero, F. Salvat.

Departamento de Neurofisiología Clínica. Instituto de Investigaciones Neurológicas Dr. Raúl Carrea. FLENI, Buenos Aires.

Objetivo: determinar si los movimientos involuntarios de los dedos de la mano en pacientes con siringomielia se deben a cambios de la excitabilidad de motoneuronas espinales. Métodos: Se estudiaron 13 pacientes adultos con siringomielia cervical mediante: 1) Registro de movimientos involuntarios con video. 2)

Electromiografía con electrodos de superficie. 3) Curva de recuperación del reflejo H: estimulación del nervio mediano con 13 pares de estímulos, con intervalos interestímulo entre 75 y 900 ms. Resultados: 1)Video: miokimia de los dedos (n=4); mioclonías espinales (n=4); temblor de acción (n=3); mioclonías estímulo sensibles (n=2). 2)EMG: se observaron descargas continuas espontáneas de unidades motoras, fasciculaciones sincrónicas y descargas mioclónicas y miokímicas. 3) Reflejo H: ausente en 6 de 26 miembros estudiados. Curva de recuperación anormal en el resto de los casos estudiados. Conclusión: La actividad continua de unidades motoras y una curva de recuperación anormal compatible con hiperexcitabilidad de motoneuronas espinales fue el hallazgo más frecuente. La lesión intramedular podría afectar neuronas inhibitorias.

**297. Ontogenia del canal de cloruro asociado al receptor GABA<sub>A</sub> en el sistema visual de las aves: Modulación por neuroesteroideos.** M. C. Graville, A. Mitridate de Novara y S. Fiszer de Plazas.

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

En trabajos previos de nuestro laboratorio hemos descripto el perfil ontogenético del receptor GABA<sub>A</sub> en el lóbulo óptico de pollo y su modulación por neuroesteroideos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar las características funcionales del canal de cloruro presente en el complejo receptor GABA<sub>A</sub> a lo largo de la ontogenia y su modulación por neuroesteroideos. A tal fin se efectuaron experimentos de captación de <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> en preparaciones de microsacos aislados en diferentes estadios del desarrollo. Los resultados obtenidos demostraron que el GABA aumentó significativamente ( $P<0,05$ ) el influjo de Cl<sup>-</sup> en estadios pre y postnatales en forma concentración dependiente. La captación máxima alcanzó su máximo valor alrededor del nacimiento ( $40,94 \pm 2,83$  nmol/mg prot). La adición del neuroesteroide alopregnanolona en el ensayo produjo una disminución en la EC<sub>50</sub> de la captación de Cl<sup>-</sup> estimulada por GABA siendo este efecto mayor en el día 14 prenatal ( $60 \pm 2\%$ ). A partir de estos resultados se puede concluir que el complejo receptor GABA<sub>A</sub> presente en el lóbulo óptico de pollo es funcionalmente activo desde estadios tempranos del desarrollo prenatal con un período de mayor actividad alrededor del nacimiento. Además, esta actividad es modulada por neuroesteroideos, mostrando un mayor efecto en estadios embrionarios.

**298. Alteraciones del sueño y cefaleas: un estudio multicéntrico.** María de Lourdes Figuerola\*, J. Saggesse#, Claudia Gandolfo#, J. Giglio@, J. Leston\*, G. Povedano#, H. Pavón#, Viviana Rocchi~, O. Bruera#.

*Unidades de Cefaleas de los Servicios de Neurología de los Hospitales: \*de Clínicas, #Bartolomé Churrúa y ~Fernández de Buenos Aires y @Rossi de La Plata.*

La anamnesis es la principal herramienta para el diagnóstico de las cefaleas primarias. A fin de evaluar la relación entre sueño y cefalea, usamos un cuestionario breve para detectar trastornos del sueño (ronquidos, insomnio, sueño no reparador, despertares y secuelas diurnas como somnolencia, confusión matinal y boca

seca) y un examen e interrogatorio sistematizado en 200 pacientes ambulatorios de cuatro Centros de Cefaleas Argentinos. Basados en el cuestionario de sueño clasificamos a los pacientes en grupos: roncadores pesados (n=61), medios (n=42) y no roncadores (n=97); sin insomnio (n=49), insomnio inicial (n=80) y otros -no inicial o complejo- (n=71). De acuerdo al cuestionario clínico los pacientes fueron divididos según criterios de la IIHS en portadores de migraña (M)(n=71), cefalea tipo tensión (T)(n=81) y otras (O)(n=48). Comparando los distintos grupo de cefaleas el ronquido fue estadísticamente más frecuente en T (pesados  $p<0,001$  y medios  $p<0,05$ ) y los despertares y otros tipos de insomnio también fueron más frecuentes en este grupo ( $p<0,001$ ). La somnolencia diurna como hallazgo aislado fue mayor en M ( $p<0,002$ ) y el insomnio inicial fue más frecuente en M que en O ( $p<0,001$ ). Estos hallazgos sugieren que los trastornos del sueño no son los mismos en los pacientes migrañosos que en los que padecen cefalea tipo tensión.

**299. Efecto de la melatonina en el insomnio primario o asociado a depresión o demencia en gerentes.** I. Fainstein, A.J. Bonetto, L.I. Brusco, D.P. Cardinali.

*Centro Médico Ing. A. Rocca, Hospital Italiano y Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA, Buenos Aires.*

El presente estudio abierto sobre la eficacia de la melatonina en el tratamiento del insomnio en ancianos comprendió 28 mujeres y 13 hombres, edad media  $74 \pm 12$ , divididos en: (a) insomnio primario (n=22); (b) insomnio asociado con depresión (n=9); (c) insomnio asociado con demencia (n=10). Los pacientes recibieron 3 mg de melatonina p.o. 30 min antes de dormir durante 21 días. El sueño se evaluó mediante entrevistas estructuradas, actogramas y agendas llenadas por los pacientes o sus cuidadores. Los resultados se evaluaron por ANOVA no paramétrico y test de Friedman (Fr) corregido. En los grupos (a) y (b), el tratamiento aumentó, a partir de los días 2-3, la calidad del sueño ( $Fr=65,1$ ,  $p<0,0001$  y  $44,2$ ,  $p<0,002$ , respectivamente) y disminuyó el número de despertares ( $Fr=70,3$ ,  $p<0,0001$  y  $41,7$ ,  $p<0,005$ ). El alerta matinal y diario sólo se incrementó en el grupo (a) ( $Fr=60,7$  y  $60,3$ ,  $p<0,0001$ ). La evaluación clínica indicó mejoría en 72% de los pacientes (a) y 50% de (b). En el grupo (c) el tratamiento no modificó los parámetros del sueño aunque se redujo el cuadro de agitación vespbral (sundowning) (7 de 10 pacientes). Asimismo disminuyó en (c) el coeficiente de variación de hora de inicio del sueño [(D.S./media) 100] de  $58,0 \pm 24,7$  (día 0-2) a  $41,5 \pm 20,9$  (día 19-21) ( $media \pm D.S.$ ,  $p<0,02$ ). En relación al uso de benzodiacepinas, 8/13 pacientes del grupo (a) las redujeron o suprimieron vs. 2/7 en los grupos (b) o (c). Estos resultados indican que la melatonina es efectiva en el tratamiento del insomnio primario en ancianos.

**300. Movimientos involuntarios anormales durante la reducción progresiva de dosis de antipsicóticos típicos.** N.M. Zelaschi, J.L. Rodríguez, F.M. Archuby.

*Hospital Neuropsiquiátrico A. Korn, Facultad de Medicina, UNLP. La Plata.*

Introducción: anteriormente hemos descrito las características de los movimientos involuntarios anormales (MIA) asociados con el uso prolongado de las drogas antipsicóticas típicas o neurolépticos. Aquí mostramos evidencia de la persistencia del

trastorno aún con una sustancial reducción de la posología habitual. Método: se estudió un grupo de 12 pacientes con trastornos esquizofrénicos - Criterio DSM III-R; la dosis(d) de APT fue transformada en equivalentes de CPZ mg/d (CPZ equiv.); APT usados: derivados de fenotiazinas y butirofenonas. Los MIA fueron cuantificados con la escala AIMS.; con el fin de evaluar la probable mejoría de los MIA en relación a la (d) se empleó la siguiente fórmula: T = puntaje de AIMS % DU, en donde (T) es el valor total obtenido de puntajes de AIMS ajustados al decremento proporcional de la dosis y DU la dosis unitaria obtenida de dosis absoluta (Da) % dosis inicial. El tiempo de seguimiento se extendió

entre un rango de 34 - 46 meses. Para evaluar si existió una disminución efectiva de dosis y de MIA se realizó para cada uno de los casos una regresión lineal en el tiempo. Once pacientes (92 %) mostraron un decremento significativo de la dosis con una alta correlación entre (d) y (t) (valores del coeficiente r entre 0.91 - 0.39). No se halló ninguna regresión estadísticamente significativa con pendiente (b) de signo negativo. Conclusiones: los resultados de este estudio sugieren que los MIA no se modifican ante una disminución efectiva de la dosis, lo cual sugeriría la posible irreversibilidad de los cambios neurológicos asociados en el sistema nervioso central a la diskinesia tardía..

## Tumores II

- 301. Requerimiento de la GTPasa Ral A en la tumorigenesis y producción de uroquinasa (uPA) y metaloproteasas (MMP) inducidas por los oncogenes v-Ras y v-Src.** J.A. Aguirre Ghiso, P. Frankel, E.F. Fariñas, Amanda Olsen, Feig L. Elisa Bal de Kier Joffé y D.F. Foster.

Dpto. de Biol. Celular, Área Investigación, Instituto de Oncología "Angel H. Roffo" U.B.A., Argentina. Dpt. Biological Sc., The Hunter College, City University of New York, USA.

Previamente demostramos que la sobreproducción de uPA en células tumorales depende de la vía de la fosfolipasa D (PLD) y proteína quinasa C. La activación de la PLD por los oncogenes v-Ras y v-Src depende de la GTPasa Ral A. Se estudió si dicha vía media la producción de uPA y MMPs y/o tumorigenesis inducida por estos oncogenes. Se utilizaron células NIH3T3 transfectadas con v-Src, v-Ras, v-Src-S28N-RalA, v-Ras-S28N-RalA (S28N-RalA mutante negativa dominante de esta enzima) o plásmido control. Las células v-Ras o v-Src mostraron un aumento significativo de la producción de uPA respecto del control (NIH3T3) medido por caseinolisis radial (C:1.15±0.5; v-Src:3.13±0.35\*; C:0.51±0.14; v-Ras: 1.38±0.1\* UI/mg prot./24 hs; \*p<0.01). La coexpresión de la S28N-RalA redujo significativamente los niveles de uPA detectados en el medio condicionado (v-Src-S28N-RalA:1.9±0.45\*; v-Ras-S28N-RalA: 0.65±0.2\*; \*p<0.01). Si bien la transformación con ambos oncogenes también aumentó significativamente la producción de las MMP-2 y MMP-9, la coexpresión de S28N-RalA solo inhibió el aumento inducido por v-Src. En ratones BALB/c inoculados s.c. con células v-Src (4x10<sup>5</sup> cél./animal, n=10) o v-Ras (2x10<sup>5</sup> cél./animal, n=10) se desarrollaron fibrosarcomas con una incidencia de 50 y 55% respectivamente. La coexpresión de S28N-RalA anuló totalmente (0% de incidencia, n=10) la tumorigenidad de estas células. Estos resultados demuestran que la vía Ral A/PLD es fundamental para transducir la señal tumorigénica por v-Src y v-Ras y para la inducción de uPA y MMPs-2 y -9 en el caso de v-Src y sólo uPA en el caso de v-Ras.

- 302. Regulación por fibronectina de la actividad uroquinasa secretada y asociada a membrana en células tumorales murinas.** AJ. Urtreger, JA. Aguirre Ghiso, Lydia Puricelli, A. Muro\*, Elisa Bal de Kier Joffé.

Área Investigación Instituto de Oncología "A.H.Roffo" Buenos Aires e \*ICGEB, Trieste, Italia.

Anteriormente hemos demostrado que la fibronectina (FN), una glicoproteína presente en plasma y en matriz extracelular reduce la capacidad metastásica de células tumorales mamarias murinas utilizando un modelo de clones celulares que reexpresan el gen de FN humana, obtenidos por transfección estable a partir de la línea celular LMM3 no productora. Además de su efecto sobre la adhesión y migración, la FN puede estar modulando otros eventos asociados con la cascada metastásica. Con el fin de evaluar

luar esta hipótesis se analizó la producción de activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), en estos clones celulares que expresan el gen de FN humana salvaje (FNwt) o mutado en el sitio RGD (FN RGD-). Los clones FN wt mostraron un aumento significativo (p<0.01) en la actividad del uPA secretada respecto del clon control, (17.85±1.5 vs. 2.96±1.7 UI/mg prot/24 hs. n=6) mientras que en los transfectantes RDG-, el incremento fue un 50% menor (7.67±2.4 UI/mg prot/24 hs.). A pesar del incremento en la secreción de uPA, los clones FNwt mostraron una dramática reducción en la capacidad de unir uPA a sus membranas, comparados con un clon RGD- y el clon control (>10±0.9 vs. 82±7.3 y 100±9.8 mUI/mg prot. respectivamente). Estos resultados sugieren que la capacidad de la FN de bloquear el desarrollo de las metástasis en estos clones celulares, podría atribuirse también a la capacidad de la FN de reducir la unión del uPA a la membrana celular, disminuyendo de esta forma su capacidad invasiva.

- 303. Estudio de la respuesta humoral en pacientes con melanoma estadio III vacunados con células alógeneicas de melanoma.** C. Kairiyama, R. Goldszmid, L. Bover y J. Mordoh.

I.I. Bioquímicas "Fundación Campomar"., CIO-FUCA, Buenos Aires.

Pacientes con estadio III de melanoma, libres de enfermedad clínicamente detectable, recibieron en un ensayo clínico de adyuvancia una vacuna alógenica constituida por 15x10<sup>6</sup> cél. de melanoma humano de las líneas IIB-MEL-LES, IIB-MEL-IAN e IIB-MEL-J, irradiadas y administradas con BCG. En un trabajo anterior se ha observado que la mediana de la sobrevida libre de enfermedad (SLE) de 30 pacientes tratados con esta terapia fue de 20,0 meses y de 7 meses en un grupo control (p<0.001). En este estudio hemos analizado por Western Blot la respuesta humoral en sueros de 44 pacientes tratados con esta vacuna, siendo la fuente de antígenos un extracto de membranas de la vacuna. Se detectaron Abs post-vacunación en 32 de ellos (73%), 10 de ellos con fuerte respuesta (23%). Los Abs reaccionaron contra Abs de membrana y son mayoritariamente de tipo IgG. Los Abs visualizados más comunes se encontraron entre 43-48 y 55-59 KDa, observándose asimismo Abs de alto peso molecular. Los sueros reaccionaron con extractos de otros melanomas, pero no contra extractos de tejidos normales. Aún en los casos de sueros reactivos, la reactividad frente a extractos de melanoma fue menor que la observada frente a extractos de BCG. Los sueros reactivos presentaron un 94% de lisis mediada por complemento vs 29% en sueros no reactivos. Esta respuesta humoral inducida por la vacuna podría estar relacionada con el aumento observado en la mediana de la SLE. Están en desarrollo nuevas estrategias para incrementar la antigenicidad de los Abs tumorales.

- 304. Efecto antiangiogénico y antimetastásico de pentoxifilina en el melanoma B16F10.** <sup>1,2</sup>R. Gude, <sup>1</sup>M. Mercedes Binda, <sup>1</sup>H. López Presas, <sup>1</sup>R. D. Bonfil, <sup>1</sup>Lab. Fundación de Investigación del Cáncer en

*CEFYBO, Buenos Aires ; <sup>2</sup> Cancer Research Institute, Mumbai, India.*

La pentoxifilina (PTX), un agente hemorreológico derivado de la dimetilxantina utilizado en el tratamiento de la enfermedad vascular periférica, ha mostrado aumentar la sensibilidad tumoral a algunas drogas quimioterápicas y a la radiación. Con el objeto de evaluar su acción sobre la capacidad angiogénica y metastásica de B16F10, se trataron diariamente ratones C57BL/6J con 0, 20 o 40 mg/kg PTX ip desde el día de inóculo con las células tumorales. En el primer caso, 18 ratones fueron inyectados id con  $10^6$  células B16F10 y siete días después se analizó el número de vasos confluentes hacia el sitio del inóculo. En los grupos tratados la angiogénesis fue menor que en el control (Mediana número de vasos [rango] : Control : 13,5 [11-14], PTX 20 mg/kg : 6,5 [6-13], PTX 40 mg/kg : 2,0 [2-5] ; Test ANOVA no paramétrico Kruskal-Wallis,  $p=0,0008$  ; Control vs. PTX 40 mg/kg :  $p < 0,001$ ). La capacidad metastásica experimental pulmonar en ratones inoculados iv 19 días antes con  $10^5$  células B16F10 también se vio inhibida en forma significativa en aquellos tratados con PTX (Mediana número de nódulos [rango] : Control : 410 [315-456], PTX 40 mg/kg : 175 [142-239] ; Test no paramétrico Mann-Whitney  $p = 0,008$ ). Experimentos de coincubación de fragmentos pulmonares y células B16F10 pretratados con PTX a dosis no tóxicas explicarían los resultados.

**305. Inhibición de metástasis espontáneas de un tumor por otro tumor no relacionado en ratones BALB/c. P. di Gianni, M. Franco, O.D. Bustuoabadi, R.P. Meiss, R.A. Ruggiero.**

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

El objetivo fue estudiar los mecanismos por los que el tumor LB, inductor de resistencia concomitante (RC), inhibe el número de metástasis del tumor C7HI, que no induce RC. Dicha inhibición se verifica tanto en ratones BALB/c normales ( $p < 0,001$ ,  $n=5$ ) como en ratones nude ( $p < 0,001$ ,  $n=4$ ). Además, esta inhibición se ejerce sobre metástasis vascularizadas ( $p < 0,01$ ,  $n=3$ ) así como no-vascularizadas ( $p < 0,01$ ,  $n=3$ ). El número de micro-metástasis (diámetro  $< 0,1$  mm) disminuyó menos drásticamente ( $p < 0,05$ ,  $n=5$ ). Similares resultados se obtuvieron con el tumor CEI. Cortes histológicos de las metástasis del tumor C7HI inhibidas por el tumor LB muestran un menor índice mitótico ( $p < 0,001$ ,  $n=7$ ) así como un mayor número de células en apoptosis medidas por PCNA y morfológicamente ( $p < 0,01$ ,  $n=6$ ). Los resultados obtenidos sugieren que los tumores LB y CEI inhiben el desarrollo de las metástasis de C7HI en forma indirecta, a través de la inhibición de la vascularización y en forma directa, a través de la inhibición de la proliferación y del aumento del número de células en apoptosis. Este último mecanismo puede ser ejercido independientemente del efecto sobre la vascularización ya que las diferencias se observaron tanto para metástasis vascularizadas como para no-vascularizadas.

**306. El anticuerpo monoclonal FC-2.15 dirigido contra cancer de mama humano, reconoce específicamente el epitope Lewis<sup>x</sup>. M.. Capurro, L. Bover, P. Portela, P. Livingston, J. Mordoh..**

*IIB-BA "Fundación Campomar"; CIO-FUCA, Argentina; Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, NY, USA;*

FC-2.15 es una IgM murina producida en nuestro laboratorio. Además de reaccionar con más del 90% de carcinomas mamarios, FC-2.15 reconoce carcinoma de colon y leucemias mieloides crónicas (LMC),uniéndose a la parte hidrocarbonada de diferentes glicoproteínas. La principal reacción cruzada es con leucocitos polimorfonucleares (PMN). FC-2.15 media la lisis *in vitro* de células antigeno (Ag) 215<sup>+</sup> por fijación de complemento humano y en un ensayo clínico de Fase I, FC-2.15 indujo respuesta anti-tumor. Las mencionadas características justificaron proseguir con la caracterización del AMC. Con el objeto de identificar el epítope reactivo del FC-2.15 se realizaron dot-blot y ELISA contra una variedad de carbohidratos; y con el fin de identificar y caracterizar los Ags presentes en cada uno de los tejidos FC-2.15<sup>+</sup>, se realizaron Western Blot sobre extractos tumorales y se estudió el efecto de diferentes tratamientos enzimáticos sobre la reactividad del FC-2.15 en los mismos. FC-2.15 reconoce específicamente el trisacárido Lewis<sup>x</sup>(Lex)(Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAc) terminalmente expuesto, sin reaccionar contra sialyl Lex, Lewis<sup>y</sup>, antígenos de grupo sanguíneo A y B, y gangliósidos. Tratamientos con PNGasa F indicaron que en PMN, LMC y células T-84 de carcinoma de colon, Lex está presente casi exclusivamente en N-glicoproteínas, mientras que en células MCF-7 de carcinoma de mama Lex está mayoritariamente en O-mucinas. Tratamiento con neuramidinasa aumenta la reactividad del FC-2.15 y en diferente proporción en PMN, LMC y células T-84 evidenciando la presencia de sialyl-Lex en los mismos (T-84 ≈ LMC > PMN), sin alterar la reactividad con MCF-7. Puede concluirse que FC-2.15 reconoce específicamente al epítope Lex y que PMN normales y diferentes células tumorales pueden expresar Lex y sialyl-Lex en muy diferente proporción y unido a diferentes proteínas. La relevancia de Lex en condiciones normales y patológicas aún no está establecida.

**307. La línea celular IIB-BR-G de cáncer de mama humano presenta amplificación *in vitro* de los oncogenes c-myc y c-fos y desarrolla metástasis espontáneas *in vivo*. L. Bover, M. Barrio, A.I. Bravo, I. Slavutsky, I. Larripa, M. Ayala, A. Bolondi, J. Mordoh.**

*IIB-BA-Fundación Campomar, Htal Eva Perón, San Martín, Academia Nacional de Medicina , Fac. Cs. Veterinarias, (UNLP), CICV- INTA., CIO-FUCA, Buenos Aires.*

IIB-BR-G es una línea celular de cáncer de mama, altamente indiferenciada, hormono-independiente, establecida en nuestro laboratorio. La expresión de antígenos (Ags) de diferenciación, Ags relacionados a grupos sanguíneos, oncogenes y genes supresores y quemoquinas entre otros, fue evaluada por inmunohistoquímica y reveló 100% de células positivas para PEM 200 kd, p53, MCP-1, Ag 5.01 y 50 % para catepsina D, siendo las mismas negativas para CEA, NCA, TAG 72, glicolípido globo-H, Lex, sTn, proteínas MDR p170 y neu. Análisis de Southern-blot mostró amplificación de los oncogenes c-myc y c-fos, este último con dos fragmentos rearrreglados. A pesar de la presencia de "double minutes" en el 90% de las células, el estudio de FISH mostró para el cromosoma # 8 y c-myc 3 copias / célula en el 45% y 36% de las células respectivamente, 5-7 copias / célula (43% y 41%) y solamente un 10 % de las células reveló una ganancia relativa del c-myc (8-15 copias) respecto del cromosoma # 8. El oncogén HER-2/neu, amplificado en el tumor primario que

originó la línea celular IIB-BR-G, no presenta alteraciones en la misma. Luego de 40 pasajes subcutáneos a partir del xenotransplante original en ratones *nude*, 80% de los recipientes desarrollaron metástasis espontáneas en ganglios linfáticos y pulmón. Este modelo experimental permite comparar los cambios producidos durante la adaptación al crecimiento *in vitro* e *in vivo*, brindando una nueva herramienta para el estudio del proceso metastásico.

**308. Cambios en la regulación de la síntesis de histamina en la carcinogénesis mamaria en ratas.** Graciela Cricco, Nora Engel, Gabriela Martín, Rosa Bergoc, Elena Rivera.

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

En carcinomas mamarios experimentales (Ca) la histamina (Hi) actúa como factor autocrino de crecimiento regulando su propia síntesis y liberación a través de receptores H1 y H2 de membrana. En este trabajo se estudió la regulación de la enzima histidina decarboxilasa (HDC) y el contenido endógeno de Hi en glándula mamaria de rata (GM) y en los Ca, mediante RIA se determinó la Hi plasmática ( $\mu\text{M}$ ) en ratas control que resultó igual en diestro  $0.93 \pm 0.30$ , estro  $0.89 \pm 0.22$ , y portadoras de Ca  $0.8 \pm 0.4$ . El contenido de Hi fue en  $\mu\text{g/gm}$ : GM diestro(I)  $28 \pm 9$ , GM estro(II)  $60 \pm 7$  ( $p < 0.01$  vs I), Ca Hormono dependientes (HD)  $121 \pm 35$  ( $p < 0.01$  vs I;  $p < 0.05$  vs II); Ca independientes (HI)  $110 \pm 48$  ( $p < 0.01$  vs I;  $p < 0.05$  vs II). En forma coincidente, los niveles basales de ARNm de HDC son indetectables en GM y positivamente modulados por E2 tanto *in vivo* como *in vitro*. En los Ca el ARNm de HDC está aumentado y no es regulado por E2 sean HD u HI pero si es modulado por Hi. Los niveles de ARNm de myc son inducidos por E2 en GM y en Ca HD, pero no en Ca HI y el mismo patrón de regulación por E2 se obtuvo para el receptor a Pg. Estos datos indican que el cambio en la regulación de HDC y en el contenido de Hi son fundamentales en la transformación neoplásica de la GM.

**309. Ensayo clínico de Fase Ib en pacientes con cáncer de mama avanzado: Combinación de anticuerpo monoclonal (AMC) FC-2.15 y poliquimioterapia. Resultados preliminares.** J. Schiafffi<sup>1</sup>, L. Bover<sup>1,2</sup>, C. Kairiyama<sup>1,2</sup>, P. Portela<sup>1,2</sup>, A. Bravo<sup>4</sup>, R. Yomha<sup>3</sup>, A. Urrutia<sup>3</sup>, J. Mordoh<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> IIB-BA-Fundación Campomar, <sup>2</sup> CIO-FUCA, <sup>3</sup> Htal. Nacional B. Rivadavia, <sup>4</sup> Htal. Interzonal Eva Perón, Buenos Aires.

FC-2.15 es un AMC reactivo contra el antígeno Lewis X (LeX) presente en cáncer de mama, colon y granulocitos periféricos normales. Un estudio previo de Fase I realizado sobre 11 pacientes (pac.) oncológicos evidenció escasa toxicidad y algunas respuestas parciales objetivas. Estudios *in vitro* realizados sobre una línea celular LeX+, demostraron efecto aditivo de la combinación FC-2.15 + Adriamicina. El objetivo de este estudio es determinar la factibilidad y toxicidad de la administración sucesiva inmediata del esquema de poliquimioterapia FEC (fluoruracilo: 600 mg / sqm; epirubicina: 70 mg / sqm; ciclosfosfamida: 600 mg / sqm. Administración ev cada 21 días) y del FC-2.15 administrado ev durante 20hs en los 3 primeros cursos de FEC (dosis

escalada 1,7 mg / kg / curso = 4 pac.; 2 mg / kg / curso = 4 pac.). Hasta el momento se incluyeron 8 pac. con carcinoma de mama avanzado. 4 pac. completaron los 3 ciclos de AMC, 2 realizaron 2 ciclos, 1 pac. 1 ciclo y 1 pac. suspendió por toxicidad. La toxicidad más importante fue leucopenia (5 / 7) que revirtió en las 24 hs post-tratamiento; 1 pac. presentó rash cutáneo tardío; 1 pac. desarrolló reacción alérgica que obligó a la suspensión del tratamiento. Otros efectos fueron fiebre (4/8), escalofríos y temblores (3/8), hipotensión (2/8) y flebitis (1/8). La toxicidad por citostáticos fue la habitual. No se registró toxicidad potenciada por la terapia simultánea ni postergación del esquema habitual de FEC. 5/5 pac. cuyos sueros fueron evaluados desarrollaron anticuerpos antimurinos (HAMA). En 3/6 pac. evaluables se observaron respuestas parciales objetivas >50%.

**310. El tratamiento con lovastatin disminuye la capacidad invasiva del linfoma de rata L-TACB.** <sup>1</sup>M. Mercedes Binda, <sup>2</sup>P. Matar, <sup>2</sup>Viviana Rozados, <sup>1</sup>R. D. Bonfil, <sup>2</sup>O. Graciela Scharovsky.

*<sup>1</sup>Lab. Fundación de Investigación del Cáncer en CEFYBO, Buenos Aires; <sup>2</sup>Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, UNR., Rosario.*

El lovastatin (LOV), droga utilizada en el tratamiento de la hipercolesterolemia, ha mostrado inhibir la farnesilación de la oncoproteína p21ras, asociada con la capacidad invasiva y metastásica en diferentes modelos tumorales. Anteriormente demostramos la actividad antimetastásica de LOV sobre un sarcoma y un linfoma de rata. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de LOV sobre la motilidad, invasividad y secreción de metaloproteasas por células L-TACB. Las células de linfoma se incubaron con dosis no citotóxicas de LOV (5, 10 y 20  $\mu\text{M}$ ) durante las 18 horas de los ensayos de motilidad o quimioinvasión, llevados a cabo en cámaras transwells con membranas con poros de 8  $\mu\text{m}$  cubiertas con colágeno IV o Matrigel, respectivamente. Los resultados se expresaron como número de células que atravesaban los filtros en respuesta al medio condicionado por células NIH.3T3. Si bien la motilidad de L-TACB no se vio significativamente alterada por el tratamiento, sí lo fue la invasividad (Media  $\pm$  E.S.: Control = 3467  $\pm$  353 vs. LOV 20  $\mu\text{M}$  = 1600  $\pm$  529;  $p < 0.05$ ). El estudio zimográfico de los medios condicionados de las células L-TACB en las diferentes condiciones mostró una actividad MMP-9 inalterada en todos los casos. Se discute la posible inhibición de otras enzimas hidrolíticas como explicación del efecto anti-invasivo observado.

**311. Expresión del factor de transformación B2 (TGF- $\beta$ 2) y diferencias en la respuesta a los efectos inhibitorios de TGF- $\beta$ 1, B2 y B3 en adenocarcinomas mamarios murinos.** MH Viegas, C Lanari, M. Goin, G. Peters, M. Salatino, EH Charreau, PV Elizalde.

*Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires.*

Se estudió la expresión del mRNA de TGF- $\beta$ 2 por Northern blots en líneas hormono-dependientes (Hd) e independientes (HI) de adenocarcinomas mamarios inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA) en Balb/c. Se detectaron transcriptos de 5 y 6 kb en líneas HD ductales. Los niveles de TGF- $\beta$ 2 fueron menores en los tumores creciendo en ratones tratados con MPA (6kb dis-

minución de 6 veces; 5Kb de 4,  $p < 0.05$ , scanning de autoradiografías de 3 experimentos). Las líneas HI ductales mostraron una disminución en la expresión de TGF- $\beta$ 2 ( $p < 0.05$ ) respecto de las HD. Líneas lobulillares HI presentaron niveles de TGF- $\beta$ 2 mRNA comparables a los de los tumores HD tratados con MPA. Cultivos primarios de células epiteliales de tumores HD fueron inhibidos por TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 y  $\beta$ 3 (1ng/ml, ensayo de incorporación de  $^3$ H-timidina, ej: Control 5243±422 MPA 10nM 8765±765, TGF- $\beta$ 1 3120±401 cpm,  $p < 0.001$ ). Las células epiteliales HI lobulillares mostraron una disminución en su sensibilidad a la inhibición por TGF- $\beta$ s siendo necesarios 10 ng/ml para inhibirlas ( $p < 0.05$ ). La resistencia a TGF- $\beta$ s no se debe a disminución en la expresión del receptor de TGF- $\beta$  tipo II (ensayos de estabilización covalente del complejo  $^{125}$ I-TGF- $\beta$ -receptor) o amplificación (Southern blots) o sobreexpresión de ciclinas D1 y D3 (Western blots) TGF- $\beta$ 2 actuaría como inhibidor autocrino de la proliferación de tumores HD. El crecimiento autónomo de las líneas HI estaría favorecido por una disminución en su respuesta a la inhibición por TGF- $\beta$ s.

- 312. Supresión del fenotipo metastásico inducido por v-Ras y v-Src por una mutante negativa de RalA. Asociación con la expresión de fibronectina (FN) y CD44.** J.A. Aguirre Ghiso, P. Frankel, Virginia. Ladeda., E.F. Farías, Amanda Olsen, Elisa Bal de Kier Joffé y D.F. Foster.

Dpto. de Biol. Celular, Área Investigación, Instituto de Oncología "Angel H. Roffo" U.B.A., Argentina. Dpt. Biological Sc., The Hunter College, City University of New York, USA.

La transformación con los oncogenes v-Src y v-Ras confiere capacidad tumorigénica y metastásica y modula la expresión de moléculas de adhesión como la FN y el CD44. Por otro lado se conoce que estos oncogenes activan la vía de señalización de la GTPasa RalA y fosfolipasa D (PLD). Se estudió si la vía RalA/PLD está implicada en la capacidad metastásica experimental y en la regulación de la expresión de FN y CD44. Se utilizaron células NIH3T3 transfectadas con v-Ras, v-Src o estas últimas cotransfectadas con S28N-Ral o plásmido control, siendo S28N-RalA una mutante dominante negativa de RalA. Mediante Western blot se observó una reducción significativa de la expresión de FN y un aumento de CD44 en las células v-Ras o v-Src. La coexpresión de S28N-RalA con ambos oncogenes restableció la expresión de FN observada en las células NIH3T3 control. Asimismo esta mutante anuló completamente la sobreexpresión de CD44 inducida por los dos oncogenes. Las células v-Ras o v-Ras-S28N-Ral ( $2 \times 10^5$  cél/animal,  $n=10$ ) y v-Src o v-Src-S28N-RalA ( $3 \times 10^6$  cél/animal,  $n=10$ ) se injectaron i.v. en ratones BALB/c y a los 21 días se contaron las colonias pulmonares. Resultados: mediana (rango), (incidencia); NIH: 0 (0-0), (0%); v-Ras: 7 (0-31), (90%); v-Ras-S28N-RalA: 0 (0-2), (14%); v-Src: 3 (0-15), (100%); v-Src-S28N-RalA: 0 (0-0) (0%). Demostramos que el bloqueo de la vía de RalA bloquea completamente la capacidad metastásica experimental inducida por v-Ras y v-Src. Además, dicha vía媒介aría la señal dependiente de estos oncogenes, que lleva a la disminución de FN o al aumento de CD44.

- 313. Obtención de una línea celular murina de adenocarcinomas de mama, estimulable por progestágenos.** C. Lanari, I Luthy, A. Molinolo,

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires.

Con el fin de desarrollar líneas celulares epiteliales estables, cuyo crecimiento fuera dependiente o respondedor a progestágenos, se utilizó el adenocarcinoma ductal murino C4-HD, que es mantenido por pasajes singenéticos. Este tumor fue inducido por acetato de medroxiprogesterona, tiene un patrón de crecimiento dependiente de progestágenos *in vivo* y expresa receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP). Entre las numerosas estrategias que se utilizaron para generar la línea, la más exitosa fue el uso del medio de cultivo DMEM F12, suplementado con 10% de SFB, tiroxina 10 nM, glutamina 2 mM, cortisol 0,3  $\mu$ M e insulina 2  $\mu$ g/ml. Luego de 2 meses de un cultivo estacionario en el repique 3, se observaron alteraciones de la morfología, como la formación de numerosos sincios asociados a un incremento significativo de la proliferación. Retrospectivamente se puede considerar este momento como el de establecimiento de la línea. A partir del 5to. repique los cultivos se trisnipizan una vez por semana. Actualmente, ya en el repique 25, las células muestran un fenotipo estable y puro, con el típico patrón de crecimiento epitelial, una gran capacidad proliferativa, expresan RE y RP (técnicas bioquímicas e inmunohistoquímica) y son estimulables con MPA ( $^3$ H-timidina) (Ej. control: 11770±1652, MPA 10nM: 49620±12150). En nuestro conocimiento esta es la primera línea celular de cáncer de mama murino RE (1) y RP(1), que responde a progestágenos.

- 314. Acción agonista de la mifepristona (RU486) en una línea celular de adenocarcinomas mamarios murinos.** C. Lanari, C. Lamb, E. Pagano, L. Helguero, V. Fabris, M. Montecchia, A. Molinolo.

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires.

Recientemente desarrollamos una línea celular derivada de un adenocarcinoma mamario murino inducido por medroxiprogesterona, que expresa receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP) y es estimulable con progestágenos. El objetivo de este trabajo fue comparar parámetros de los cultivos primarios con los de la línea celular, especialmente la evaluación del rol del RP en la proliferación. La línea se cultivó en presencia de 5% de SFB adsorbido con carbón activado, y se evaluó la capacidad del antiprogestágeno mifepristona (MFP) para inhibir la proliferación de cultivos primario y de la línea en su pasaje 17, utilizando incorporación de  $^3$ H-timidina. Mientras que la MFP inhibió la proliferación en todo el rango de concentraciones evaluadas ( $10^{-8}$ - $10^{-11}$ ) en los cultivos primarios, en la línea celular estimuló significativamente la proliferación celular (Ej. control: 11770±1652, MFP 10nM: 49960±2240cpm). Los datos bibliográficos sugerirían que en este caso, la MFP podría estar ejerciendo un efecto agonista por activación del RP a través de la vía del AMPc.

- 315. Receptores de progesterona y crecimiento tumoral en cáncer de mama murino.** C. Lamb, M. Montecchia, A. Molinolo, C. Lanari.

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires.

En trabajos previos demostramos que líneas tumorales *in vivo* de adenocarcinomas mamarios murinos inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA) que expresan receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP) retrogradan con tratamiento

con antiprogestágenos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el rol del RP en el crecimiento de tumores progestágeno-dependientes (PD) e independientes (PI). Se evaluó la capacidad de oligonucleótidos antisentido del RP (asRP) que incluyen el codón de iniciación de la isoforma A, de inhibir la proliferación celular de cultivos primarios del tumor 592-HI (PI) y de cultivos PD (C4-HD) estimulados con 10nM MPA ó bFGF (100ng/ml). Los asRP (20-0.6 µg/ml), inhibieron la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina de células epiteliales 592-HI y C4-HD estimuladas con MPA (Ej. 592-HI control: 1591±325, con 0.8µg/ml: 1124±161 con 0.8µg/ml: 1585±147 cpm) y no alteraron la proliferación de células epiteliales C4-HD estimuladas con bFGF. Como control se usaron oligonucleótidos sentido del RP, que sólo inhibieron en forma inespecífica en la concentración más alta. Se concluye que el RP está involucrado en el crecimiento aparentemente autónomo de los tumores PI y que la vía de estimulación del bFGF no estaría interactuando con los RP.

**316. Terapia Fotodinámica en un adenocarcinoma murino con ácido 5-aminolevúlico tópico e intratumoral Adriana Casas\*, H. Fukuda\*, R. Meiss\*\* & A. M. del C. Batlle\*.**

\*Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP), CONICET-UBA; \*\* Departamento de Patología, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.

Utilizando las porfirinas sintetizadas a partir de ácido 5-aminolevúlico (ALA) aplicado localmente sobre el tejido tumoral, evaluamos la efectividad del tratamiento fotodinámico (TFD). Se administró ALA por vía intratumoral (i.t.) (30 mg/cm<sup>3</sup> tumor) o tópica (crema al 20%) a ratones portadores del adenocarcionoma mamario M2. La acumulación de porfirinas fue más eficiente con la vía i.t., alcanzando 2,3 ± 0,7 µg/g tejido. Para ambas formas de administración el tiempo óptimo para la irradiación se encontró entre las 2 y las 4 hs post-ALA. Se estudió la respuesta tumoral mediante el análisis de las curvas de crecimiento, índices de efectividad e histología. La reducción del volumen tumoral promedio fue a las 24 hs post-tratamiento del 44% para la vía tópica y del 57% para la i.t. y del 66 y 63% respectivamente a las 48 hs. Cuando se practicaron sucesivas aplicaciones de TFD, la respuesta se mantuvo constante, demostrando la ausencia de resistencia. Se observó además la aparición de zonas necróticas, ulceración y formación de escaras en los tumores tratados. El hallazgo microscópico más llamativo fue la inducción del proceso apoptótico en un gran porcentaje de células tumorales y la ausencia de respuesta inflamatoria celular. Los resultados indican que la vía i.t. es la más adecuada para el tratamiento de tumores de mayor volumen, y la tópica para los más pequeños.

**317. Sensibilidad a antraciclinas en una línea celular de carcinoma de colon con alta expresión de la glicoproteína gp170. G. A. López<sup>1</sup>, Laura Vargas Roig<sup>2</sup>, R. Gude<sup>1,3</sup>, D. R. Ciocca<sup>2</sup>, R. D. Bonfill<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Lab. Fundación de Investigación del Cáncer en CEFYBO, Buenos Aires; <sup>2</sup>Lab. Reproducción y Lactancia del CRICYT, Mendoza; <sup>3</sup>Cancer Research Institute, Mumbai, India.

El aumento de la expresión de la glicoproteína gp170, bomba de flujo ATP-dependiente que actúa expulsando del interior de la

célula a diferentes fármacos antineoplásicos, suele estar asociado a un fenotipo resistente a multidrogas en diversos tumores malignos. Nosotros generamos *in vitro* la línea resistente a epidoxorubicina (Epi) HCT15-EDR a partir de la línea celular de carcinoma de colon humana HCT15. Al comparar la quimiosensibilidad a Epi de HCT15-EDR con la de HCT15, observamos que la primera era más de 100 veces más resistente a la droga que la línea original, en función de su concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>). Con el objeto de analizar la expresión de gp170 en las líneas sensible y resistente a Epi, con la intención de explicar la resistencia adquirida, ambos tipos de células fueron analizadas por inmunohistoquímica utilizando anticuerpos monoclonales contra gp170. La expresión de la glicoproteína se halló expresada en ambos casos en alto grado (Intensidad: 3 [alta], proporción: 4 [>66 % células inmunonegativas]), no mostrando diferencias estadísticas significativas entre ellas. Estos resultados sugieren que el simple estudio de la expresión de gp170 no basta para asegurar la resistencia/sensibilidad de las células tumorales a los agentes quimioterápicos.

**318. Efecto citotóxico de alcaloides purificados del tunicado *Aplidium meridianum*. Lydia Puricelli, J Palermo, Laura Hernandez Franco, Alicia Seldes, Elisa Bal de Kier Joffé.**

Instituto de Oncología "A. H. Roffo" y Departamento Química Biológica FCEyN (UBA), Buenos Aires..

En oncología es importante hallar nuevas drogas que complementen el efecto citotóxico de las tradicionales y/o que añadan nuevos efectos. Estudiamos la actividad citotóxica de 5 componentes purificados de una familia de alcaloides indólicos sustituidos con un anillo de 2-amino-pirimidina, 4 de ellos bromados, aislados del tunicado *Aplidium meridianum* (PM 215-305 Da). Líneas celulares humanas y murinas fueron tratadas con los compuestos (1nM-100uM). A las 72h se cuantificó la actividad metabólica mitocondrial como medida de viabilidad. El único alcaloide no bromado no mostró actividad citotóxica. Los otros alcaloides presentaron alta citotoxicidad sobre la línea Hep-2 (carcinoma de laringe humano), con una DC50 entre 1,15 y 7,3 uM, según la posición del Br. Estos compuestos presentaron una DC50 hasta 20 veces mayor (entre 22,3 y 37,2 uM) sobre la línea diploide normal humana PTP. La línea LMM3 (tumor mamario murino) resultó menos sensible que las células tumorales humanas (DC50 entre 33,9 y 9,3). El efecto fue dependiente de la dosis y del tiempo. Los compuestos inducen apoptosis (naranja de acridina) y la células en fase S fueron las más susceptibles (citometría de flujo). Mediante un ensayo de desplazamiento del colorante verde de metilo no se pudo detectar interacción de los compuestos con el ADN. Estos alcaloides indólicos bromados poseen alta actividad citotóxica que los hace potencialmente útiles como drogas antitumorales.

**319. Inducción de alteraciones en el ciclo celular en el tumor secundario LB inhibido por resistencia concomitante. M. Franco, PD di Gianni, OD Bustuoabadi, MI Piazzon, RA Ruggiero.**

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

La resistencia concomitante (RC) es la inhibición del crecimiento de un segundo implante tumoral en un individuo portador de un tumor primario. Con el fin de conocer los mecanismos a nivel celular de la RC nos preguntamos si la RC estaba asociada a alteraciones en la distribución en el ciclo celular. Las células del tumor secundario LB inhibido por RC en ratones BALB/c fueron extraídas y teñidas con ioduro de propidio y su distribución en el ciclo celular fue estudiada mediante citofluorometría de flujo. El tumor secundario LB inhibido por RC presentó alteraciones citocinéticas con respecto al grupo control, con aumento de la fracción S y disminución de la población en fase G<sub>2</sub>-M, siendo ésta su distribución: G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>: 66.7 + 1.4, S: 29.7 + 0.6 ( $P < 0.001$ ), G<sub>2</sub>-M: 3.5 + 1.3 ( $P < 0.001$ ) (control: G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>: 75.6 + 3.9; S: 10.9 + 4.9, G<sub>2</sub>-M: 9.8 + 1.1) (n:7). Alteraciones similares fueron halladas en células LB incubadas *in vitro* con suero de complemento de ratones portadores de LB, cuya actividad inhibitoria había sido demostrada anteriormente en asociación con la RC. La RC estaría ligada a cambios citocinéticos que podrían deberse a un retardo en la fase S y una acción similar sería ejercida *in vitro* por factores antitumorales derivados del suero.

- 320. Expresión de CD44 en tumores cerebrales.** Virginia Ladeda, Ana Morandi, Stella Ranuncolo, Mirta Varela, J. M. Lastiri, Guadalupe Pallotta, Elisa Bal de Kier Joffé, Elena Matos, Lydia Puricelli.

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

Los tumores cerebrales, aunque raramente dan metástasis, son altamente invasivos. El ácido hialurónico (AH), principal componente de la matriz extracelular del parénquima cerebral, podría modular la invasión celular. El receptor de AH, CD44, participa en procesos de migración celular. CD44 existe en la forma estándar (CD44s) y como variantes (CD44v) de mayor peso molecular. En algunos tumores se correlacionó la expresión de dichas variantes con la capacidad metastásica. En este trabajo hemos analizado por inmunohistoquímica, la expresión de CD44s, v3, v4/5 y v6 en 34 tumores cerebrales. En el tejido cerebral peritumoral, los astrocitos mostraron positividad leve a nivel de membrana. En el caso de los tumores cerebrales, se observó alta expresión de CD44s (más del 70% de las células) en el 93% de los glioblastomas multiformes (13/14), en el 60% (3/5) de los astrocitomas anaplásicos y en el 50% (4/8) de los astrocitomas de bajo grado. Este incremento de expresión de CD44S se asoció linealmente con el grado de agresividad de Burger (Test MH para asociación lineal,  $p < 0.01$ ). Todos los ependimomas (4/4), de bajo grado de malignidad, mostraron alta expresión de CD44s, mientras que los meduloblastomas, tumores indiferenciados y agresivos, mostraron nada o muy escasa tinción (3/3). No se detectó expresión de las variantes en ninguna de las muestras analizadas.

- 321. Expresión y función del receptor CD44 en una línea celular tumoral murina.** Virginia Ladeda, Aguirre Ghiso J., Elisa Bal de Kier Joffé.

*Instituto de Oncología "A.H. Roffo", Buenos Aires.*

Evidencias experimentales sugieren que CD44, receptor del ácido hialurónico, está involucrado en procesos de invasión y metástasis. Hemos estudiado la función, expresión y distribución de CD44, en una línea celular tumoral mamaria murina, F311,

con alta capacidad invasiva y metastásica. Mediante western blot (WB) demostramos que las células F311 expresan niveles más altos de CD44 que células mamarias normales murinas. Por inmunohistoquímica, se observó que en etapas tempranas de la extensión celular (spreading), CD44 se localiza en forma continua en la membrana plasmática. En estadios más avanzados del spreading, la tinción sólo se localiza en zonas inter-lamelares y en los polos de retracción, siendo prácticamente nula al completar el spreading (confirmado por WB). Al incubar las células F311 con un anticuerpo monoclonal anti-CD44, la adhesión a los 60 minutos fue inhibida en un 74%, el spreading a los 180 min se redujo en un 75% y la migración en cámaras Transwell presentó una inhibición del 64%. El tratamiento de células F311 con ésteres de fórmico o ácido fosfatídico, aumentó la expresión de CD44. Esto sugiere que tanto PKC como PLD regularían la expresión de CD44. Estos resultados demuestran que CD44 tiene un importante rol durante la adhesión, spreading y migración de células tumorales.

- 322. Mortalidad por cancer de mama (CM) en 1977-81 y 1988-92 en Rosario. Asociación con factores socio-económicos.** María S Dagatti, Stella M Pezzotto, Leonor Poletto.

*Inst. Immunología, Fac. Medicina, UNR. Rosario.*

Objetivo: Estudiar la evolución de la mortalidad por CM en Rosario y sus áreas censales. Métodos: Se revisaron los certificados de defunción de todas las mujeres fallecidas durante los quinquenios 1977-81 y 1988-92. Se calcularon las tasas de mortalidad (TM) específicas por edad y ajustadas por edad (TMA), para la ciudad y sus áreas censales. Resultados: La TMA fue 35.6‰ para el período 1977-81 y 38.2‰ para 1988-92. Las áreas de más alto nivel de vida presentaron TMA similares a las del período anterior. En las áreas más carenciadas se dieron importantes incrementos. Ejemplo: Área 2: TMA 1977-81: 30‰, TMA 1988-92: 31‰. Tasa de Fertilidad (TF): 35%, Población con necesidades básicas insatisfechas (NBI): 6%, Desnutrición crónica (% de niños de 6 años con retraso en el crecimiento: DC): 3%, Población con estudios universitarios (UNI): 23%. Área 21: TMA 1977-81: 18‰, TMA 1988-92: 44‰, TF: 42%, NBI: 27%, DC: 7%, UNI: 2%. Conclusión: La TM por CM para Rosario aumentó ligeramente. Los mayores incrementos se encontraron en las áreas más pobres.

- 323. Efecto del agonista  $\alpha_2$ -adrenérgico Clonidina en células de cáncer de mama humano MCF-7 en cultivo.** Stella Maris Vázquez, O. Pignataro, Isabela Lüthy.

*IBYME, Conicet, Buenos Aires.*

Habíamos descripto que células de cáncer mamario humano MCF-7 en cultivo responden a catecolaminas aumentando la incorporación de Timidina tritiada. El objeto de este trabajo fue corroborar si este efecto era  $\alpha_2$ -adrenérgico mediante un agonista específico y el acoplamiento a una disminución de cAMP. Las células (5000/pozo) fueron tratadas durante 3 días con concentraciones crecientes de Clonidina (Clo). Además concentraciones crecientes de Prazosin (Pra, antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico) o Yohimbina (Yo, antagonista  $\alpha_2$ -adrenérgico) fueron incubados en presencia de Clo 5 pM. Se midió incorporación de Timidina tritiada. También 30.000 células fueron sembradas e incubadas en las mismas condiciones, para medir los niveles de cAMP estimulados con Forskolina por

RIA. El agonista específico Clo provocó un aumento significativo de la incorporación de Timidina (Clo 30 pM :  $4517 \pm 118$  cpm vs C:  $3524 \pm 87,7$  pM  $p < 0,001$ ) con un ED<sub>50</sub> de 0,138 pM. Pra revirtió dicha estimulación con un ED<sub>50</sub> de 135,5  $\mu$ M, mientras que Yo con un ED<sub>50</sub> de 4,17  $\mu$ M. Cuando se midieron los valores de cAMP estimulados por forskolina, Clo 1 pM provocó una significativa disminución del contenido de cAMP ( $166 \pm 43,2$  vs  $449 \pm 57,6$  pmol/  $10^3$  células;  $p < 0,001$ ), revirtiéndose dicho efecto por Yo 5  $\mu$ M ( $349 \pm 60,8$ , NS respecto del control), mas no por Pra. Por lo tanto mediante el agonista específico y niveles de cAMP se confirmó que el efecto estimulatorio es  $\alpha_2$ -adrenérgico.

**324. Asociaciones teloméricas (TAS) en patologías con predisposición al desarrollo neoplásico.**  
Alejandra Cottiar, Ariela Fundia, JC Gómez, Alicia Sambuelli, C. Morán, Irma Slavutsky.

*IIHEMA Academia Nac. de Medicina, Hosp. Udaondo, Buenos Aires.*

Se denomina TAS a la fusión de los extremos de dos o más

cromosomas, sin pérdida visible de material genético, siendo consideradas como un fenómeno de instabilidad cromosómica. En este trabajo se analizó la presencia de TAS en 2 patologías con predisposición al desarrollo neoplásico: colitis ulcerosa (CU) (10) y pancreatitis crónica (PC) (7) y en 8 controles (C). Se efectuó cultivo de linfocitos de sangre periférica en medio F-10 suplementado con 15% de suero fetal bovino y fitohemaglutinina, a 37°C durante 72 hs. Se analizaron 100 células por individuo, evaluándose el número de TAS y el número de células con TAS. El análisis estadístico se efectuó con el test de Kruskal-Wallis. El número de TAS fue de  $10,90 \pm 2,43$  en CU y de  $8,86 \pm 2,28$  en PC, ambos significativamente aumentados respecto de los C ( $1,12 \pm 0,44$ ) ( $p < 0,002$ ). Se observó un incremento significativo en el número de células con TAS:  $8,40 \pm 1,63$  para CU y  $7,71 \pm 1,93$  para PC, respecto de los C:  $0,87 \pm 0,87$  ( $p < 0,001$ ). Fueron más frecuentes las TAS de simple cromátide: 96,44% en CU y 94,78% en PC, siendo los cromosomas más implicados: 5, 11 y 16 para CU y 2, 9 y 20 para PC. Estos resultados indican la presencia de inestabilidad cromosómica en estos pacientes, que podría estar relacionada con la incidencia aumentada de desarrollo neoplásico asociada a estas patologías.

## Transporte

- 325. Efecto del péptido auricular natriurético (ANP) sobre la actividad óxido nítrico (NO) sintetasa en el intestino de rata.** L. González Bosc\*, F. Capani<sup>†</sup>, J.J. López-Costa<sup>†</sup>, M. Ortiz\*, N. Vidal\* y J. Pecci Saavedra<sup>†</sup>

*Biol. Cel. Histol., Medicina y \*Biol. Cel. Histol., Farm. y Bioq., UBA, Buenos Aires.*

El ANP aumenta la producción de NO en cultivos primarios de células de tubulo proximal humano. El azul de metileno inhibe la acción del ANP sobre la absorción intestinal de sodio y glucosa *in vitro* y recientemente se ha considerado que el NO juega un papel importante en el control del flujo sanguíneo y el transporte iónico en el tracto gastrointestinal. El objetivo de este estudio fue verificar si el ANP modifica la actividad de la NO sintetasa en el intestino delgado (ID). Se realizaron experimentos *in vitro* e *in vivo*. *In vitro*: Se extrajeron tres segmentos de ID. Se dividieron en tres grupos que se incubaron en: Krebs solo, con 1 μM ANP o con 1 mM de L-NAME y 1 μM ANP, a 37°C durante 10 min. *In vivo*: se infundió durante 30 min ANP (0.2 μg/Kg/min) o solución fisiológica a ratas anestesiadas, y se les extrajo un segmento de ID. Todos los segmentos se fijaron en paraformaldehído 4%, se congelaron a -20°C y se cortaron con un crióstato. Los cortes fueron procesados con el método histoquímico para la NADPH-diaforasa. La visualización, medición de DO y fotografía se realizaron con un microscopio Zeiss Axiophot. *In vitro*: (n=20) DOcontrol = 0.291 ± 0.005, ANP = 0.397 ± 0.008 (p < 0.001 vs control, NAME+ANP) y NAME+ANP (n=10) = 0.296 ± 0.008. *In vivo*: (n=20) DOcontrol = 0.49 ± 0.02 y ANP = 0.95 ± 0.05 (p < 0.0001). Se observa una mayor reactividad en los tejidos tratados con ANP que en los controles. Estos resultados muestran que el ANP aumenta la producción de NO y sugieren que el mismo podría ser un segundo mensajero o intermediario de la acción del ANP sobre el transporte iónico epitelial.

- 326. Buscando el sitio de acción del cAMP en sinapsis neuromuscular de mamífero.** Adriana Losavio, S. Muchnik.

*Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, UBA, Buenos Aires.*

En trabajos anteriores hemos demostrado que en sinapsis neuromuscular de mamífero, tanto la aminofilina (AMIN), inhibidora de la fosfodiesterasa, como el 8-Br-cAMP, aumentan la frecuencia de los potenciales de placa miniatura (fMEPPs) más del 100 %, sugiriendo una acción presináptica, aunque el sitio preciso todavía no está aclarado. Una posibilidad es que esa facilitación estuviese vinculada a la activación de una proteinkinasa A-cAMP (PKA) asociada a los canales de calcio voltaje-dependientes (CCVD) que intervienen en la liberación espontánea de ACh. En preparaciones frénico-diafragma de ratas se investigó el efecto de 1 mM AMIN en condiciones donde el influjo de Ca<sup>2+</sup> a través de los CCVD no fuera posible: A) en 0Ca<sup>2+</sup>-EGTA 1 mM; B) en Cd<sup>2+</sup> 100 μM, bloqueante universal de los CCVD. En A se observó una disminución (↓ de fMEPPs del 68.0 ± 7.7 % con respecto a los valores en Ringer normal, mientras que el aumento (↑ de fMEPPs por AMIN en 0Ca<sup>2+</sup>-EGTA fue sólo del 14.9 ± 11.0 %, n=4. Para

determinar si este resultado se debía a una disminución de la [Ca<sup>2+</sup>]i como consecuencia del eflujo de Ca<sup>2+</sup> por inversión de su gradiente, se comparó el % ↓ de fMEPPs en 0Ca<sup>2+</sup>-EGTA (68.0 ± 7.7, n=4) con el % ↓ de fMEPPs en 0Ca<sup>2+</sup>-EGTA luego que los CCVD fueran bloqueados por Cd<sup>2+</sup> (58.5 ± 1.5, n=4, p < 0.05). Los resultados en B fueron: % ↓ de fMEPPs en Cd<sup>2+</sup> 47.1 ± 0.1, % ↑ de fMEPPs por AMIN en Cd<sup>2+</sup> 187.3 ± 19.3, n=3. Estos resultados sugieren que la activación presináptica de la PKA facilita el proceso secretorio principalmente en un paso más allá de los CCVD, siendo para ello necesario una [Ca<sup>2+</sup>]i adecuada.

- 327. Eflujo de K activado por cafeína en músculo esquelético.** R. A. Venosa, A. Hoya, M. C. Abel.

*Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de C. Médicas, UNLP, La Plata.*

Hemos encontrado que la aplicación de cafeína (3-4 mM) al músculo esquelético de rana genera un marcado incremento en el eflujo de K ( $\Delta k_K$ ). Se usaron sartorios apareados y <sup>42</sup>K como trazador. El efecto tiene las siguientes características: 1) es producido por el aumento del Ca citosólico ([Ca]<sub>i</sub>) liberado por el retículo sarcoplasmico; 2) El bloqueo de canales de K dependientes de Ca de alta conductancia (BK<sub>C</sub>) por caribdotoxina (23 nM), redujo  $\Delta k_K$  en un 22 %; 3) tolbutamida (800 μM), un inhibidor de los canales de K dependientes de ATP (K<sub>ATP</sub>), disminuyó  $\Delta k_K$  en un 23 %; Ba, un bloqueador de la mayoría de los canales de K, no impidió  $\Delta k_K$ ; 4) La ausencia de Na en el medio externo redujo  $\Delta k_K$  en un 40 %; 5) amiloride (5 mM) inhibió más del 50 % de  $\Delta k_K$ . Conclusión: el incremento de [Ca]<sub>i</sub> por liberación de Ca del retículo sarcoplasmico inducido por cafeína, genera un  $\Delta k_K$  que representa la activación de dos canales de K (BK<sub>C</sub> y K<sub>ATP</sub>) y de un proceso dependiente de [Na]<sub>i</sub> e inhibible por amiloride que podría ser parte del intercambiador Na/Ca.

- 328. Permeabilidad al ion cloruro en fibras musculares de anfibio en presencia de DIDS.** C.F. Kusnier, B.A. Kotsias.

*Instituto A. Lanari, UBA, Buenos Aires.*

Se realizaron mediciones de potencial de membrana (Vm) en fascículos de músculo semitendinoso y de corriente de Cl<sup>-</sup> (ICl) en fibras de músculo lumbrical de sapo con voltage clamp. El propósito fue conocer en más detalle la permeabilidad al Cl<sup>-</sup> con la ayuda de DIDS, un bloqueante utilizado en otras preparaciones. Para las mediciones de Vm, las fibras fueron equilibradas en 136 mM de K<sup>+</sup> con SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> como principal anión y luego expuestas por 2-4 min y sucesivamente a diferentes soluciones con Cs<sup>+</sup> en lugar de K<sup>+</sup>. Se obtuvieron hiperpolarizaciones en las soluciones con Cs<sup>+</sup> con el agregado de 40 mM de NaCH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>, 40 NaNO<sub>3</sub> y 40 de NaCl, evidenciando cada hiperpolarización los valores relativos de permeabilidad (p) del ión reemplazante respecto a la del K<sup>+</sup> (SD, n=24). En Cs-NaCH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>, Vm = -42 (16 mV, pCs/pK = 0.27; Cs-NaNO<sub>3</sub>, Vm = -63 ± 8 mV, pNO<sub>3</sub>/pK = 4.5; Cs-NaCl -80 ± 9 mV, pCl/pK = 12. Pudimos comprobar que DIDS (1 mM) afectaba la ICl ya que Vm en Cs-NaCl sólo alcanzó los -66 ± 11 mV, pCl/pK = 5.5, sin afectar los valores obtenidos con otros iones. En

concordancia con este dato, 1 mM DIDS redujo las ICl en respuesta a pulsos de comando hiperpolarizantes de -18 a -111 mV (holding potential = -5 mV). Así la ICl inicial en respuesta a un pulso de -111 mV fue  $-60 \pm 6$  y  $42 \pm 10 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (SD, n=4) para la solución control y DIDS respectivamente.

**329. Manifestación eléctrica del intercambiador Na-Ca INC) en fibras musculares esqueléticas de anfibio.** B. A. Kotsias, R.A. Venosa.

*Instituto A. Lanari, UBA y Cátedra de Fisiología, Fac. Medicina, La Plata.*

El objetivo de este trabajo es el de medir la corriente eléctrica del INC que puede ser activado aumentando la [Ca]<sub>i</sub> con cafeína. Esta droga (4 mM) despolariza 10 mV a las fibras en Ringer control y 30 mV en 0 Cl<sup>-</sup> siendo estos efectos bloqueados por 0 Na<sup>+</sup> o Ni<sup>2+</sup> (5 mM). Esto sugiere que la despolarización es generada por el INC en modo forward (Ca<sub>i</sub> x Na<sub>o</sub>) con un cociente Na/Ca >2. Para las mediciones de corriente con voltaje clamp las fibras fueron expuestas a 0 Cl<sup>-</sup> y anuladas las conductancias de Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y actividad de bomba Na-K con nifedipina, TTX, 3-4 DAP y ouabáina. Para disminuir la actividad mecánica por cafeína, se agregó 5 mM de BDM, una droga que reduce en un 50% la respuesta muscular. El holding potential (HP) fue -60 mV, asegurando el modo forward del INC. La cafeína incrementó la corriente basal ( $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) en  $3.9 \pm 0.6$  (SE, n=8), valor que fue de  $1.4 \pm 0.3$  en 0 Na<sup>+</sup> (n=8, p < 0.0018) y  $2.3 \pm 1.4$  en 5 mM amiloride (n=10, p < 0.025). La corriente estimada en las despolarizaciones por cafeína ( $1.7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) es muy parecida a la fracción sensible a amiloride de la corriente generada por la cafeína medida con voltage clamp. La dependencia con el Na<sup>+</sup> externo de la despolarización y del aumento en la corriente basal por la cafeína indican que estos fenómenos son la expresión del INC en fibras enteras.

**330. Metabolismo celular del ejercicio y la fatiga muscular.** I. Gigli, A. Aguero, L.E. Bussmann.

*Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires.*

La fatiga muscular es una de las patologías más frecuentes en los equinos deportivos. El objetivo del trabajo fue estudiar las modificaciones de distintos parámetros bioquímicos producidos por el ejercicio. Se utilizaron ratas Sprague Dawley sometidas a un protocolo de entrenamiento (treadmill). Los animales fueron divididos al azar en grupo control, corridos durante 90 min. y hasta el agotamiento. Los músculos gastrocnemios fueron resecados dentro de los 2 minutos del sacrificio, y las muestras para determinación de metabolitos, inmediatamente congeladas en N<sub>2</sub> líquido. Se dosaron las enzimas séricas CPK y AST, consideradas indicadores de lesión muscular. Se determinaron actividad ATPasa Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup> dependiente y captación y liberación de Ca<sup>2+</sup> por el retículo sarcoplasmático en homogenato. Para la determinación del consumo de oxígeno se utilizó la fracción mitocondrial. Se observaron diferencias significativas (p < 0.05) en la liberación de Ca<sup>2+</sup> (control:  $3.12 \pm 0.11 \mu\text{mol min.}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ; agotados:  $2.02 \pm 0.12 \mu\text{mol min.}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ), mientras que en la respiración mitocondrial luego de 90 min. de ejercicio, se encontraron diferencias en el estado 3 (control  $0.418 \pm 0.03 \mu\text{atm O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  vs.  $0.194 \pm 0.03 \mu\text{atm O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ). Esto sugiere una alteración en la función mitocondrial previa a los cambios en el transporte de Ca<sup>2+</sup> del retículo sarcoplasmático.

**331. Efecto de la Endotelina-3 (ET-3) sobre el transporte intestinal de iones.** M. Majowicz\*, L. González Bosc\*, M. Costa\*, M. Ortiz\*, A. Balaszczuk\*, C. Arranz\* y N. Vidal\*.

*Cátedras de Biología Cel. e Histol.\* y de Fisiología\*. Fac. de Fcia. y Bioq. UBA. PROSIVAD-CONICET, Buenos Aires.*

En estudios previos *in vivo* se demostró que la infusión de ET-3 (50 ng/Kg/min) en ratas expandidas al 10% de su peso corporal revierte el efecto provocado por la expansión de volumen sobre la secreción de cloruro; mientras que en ratas controles no produce ningún efecto. El objetivo de este trabajo fue: 1) estudiar si la ET-3 posee algún efecto sobre el transporte iónico a través del epitelio del intestino delgado de rata *in vitro*; y posteriormente, 2) determinar sobre qué transporte/s iónico/s actúa específicamente la ET-3. Para ello se utilizó la técnica de clampeo de voltaje en cámara de Ussing. La adición al lado seroso del tejido de ET-3  $1 \pm 0.1 \mu\text{M}$  disminuyó un  $33.54 \pm 4.3\%$  la diferencia de potencial (DP) (p < 0.05) y un  $20.9 \pm 5.8\%$  la corriente de cortocircuito (Isc) (p < 0.05) sin modificar la conductancia (G). Para comprobar si este efecto se debía a una disminución de la absorción de sodio mediada por la inhibición del cotransporte sodio-glucosa (SGLT), se utilizó Floridzina (Phlz), un inhibidor específico del SGLT. Al agregar ET-3 al tejido pretratado con Phlz, se observó que disminuyó un  $23.7 \pm 2.4\%$  la DP (p < 0.05), sin cambios en la Isc ni en la G (n=6). Estos resultados sugieren que la ET-3 *in vitro* inhibiría, al menos en parte, al SGLT, y que afectaría además algún otro mecanismo de transporte iónico del epitelio intestinal; posiblemente la permeabilidad de la vía paracelular.

**332. Análisis cinético del intercambiador Na/Li en eritrocitos de adolescentes normales con o sin antecedentes hipertensos.** Raquel E. Serrani, Susana Lioi, Beatriz Tamagno, Teresa Fraix, D. Taborda y J.L. Corchs.

*Fisiología Humana, Fac. Cs. Médicas y Bioq. Clínica, Fac. Cs. Bioq. y Farm., UNR, Rosario.*

Ha sido referido que alteraciones del mecanismo de intercambio Na/Li se hallarían relacionadas a patologías como hipertensión arterial y diabetes mellitus insulino-dependiente con riesgo de desarrollar hipertensión. A efecto de determinar si es posible detectar algún parámetro cinético de este mecanismo de transporte que estuviese precozmente modificado, se determinó en eritrocitos de adolescentes normotensos no hiperreactivos flujo de Li en función de la concentración de sodio extracelular. La cinética de activación se ajustó por funciones hiperbólicas, determinándose valores de Km (mM) y Vmáx (mmoles/l cél. h). Se discriminaron 2 grupos según la ausencia (a) o la presencia (p) de antecedentes de hipertensión en antecesores inmediatos y mediados. Los valores de Km ( $6.94 \pm 0.79$  (a) y de  $3.85 \pm 0.97$  (b)) difirieron significativamente, p < 0.001. No difirieron significativamente (p < 0.05) los valores de Vmáx ( $0.42 \pm 0.11$  (a) y  $0.67 \pm 0.04$  (b)). El parámetro intensivo Km se encuentra modificado en normotensos no hiperreactivos con antecedentes de hipertensión arterial (progenitores inmediatos y mediados). Debido al hecho de que este parámetro depende de factores hereditarios, se sugiere que podría ser considerado como índice de riesgo de desarrollo de hipertensión esencial. El parámetro extensivo Vmáx, sensible a factores medioambientales (celulares) se encontraría alterado (en pacientes con esta patología ya desarrollada) como producto del proceso patológico "per se" y no de factores hereditarios.

**Endocrinología III**

- 333. Efectos de la exposición crónica a elevados niveles de hormona de crecimiento (GH) sobre el número y la autofosforilación del receptor de insulina (IR) : rol de la hiperinsulinemia.** Fernando Dominici, A. Balbis, D Turyn.

IQUIFIB, Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Buenos Aires.

Se investigó el mecanismo por el cual la exposición crónica a elevados niveles de GH origina resistencia a la acción de la insulina (Ins), usando ratones transgénicos para GH. Los mismos evidencian resistencia a la acción de la insulina indicada por glucemia normal junto con hiperinsulinemia. Se detectó una disminución del 35 y 40% en el número de receptores de insulina (IR) hepáticos (IR expresados en membrana y totales respectivamente). Por el contrario, en hígado se detectó un aumento del 54% en la actividad de autofosforilación de los IR. Para determinar si dichas alteraciones son consecuencia de un efecto directo de la exposición crónica a elevados niveles de GH o son secundarias a la hiperinsulinemia inducida por GH, se disminuyeron los niveles circulantes de Ins mediante tratamiento con streptozotocina (STZ), o exposición a un ayuno de 48 hs. Luego de dichos tratamientos, los niveles de GH permanecieron elevados; mientras que el número de IR hepáticos aumentó hasta valores similares (ayuno), o incluso superiores a los normales (tratamiento con STZ). De similar modo, la actividad de autofosforilación de los IR se normalizó luego del tratamiento con STZ, y se redujo a valores menores a los normales luego del ayuno. Los resultados indican que las alteraciones observadas son secundarias a la hiperinsulinemia.

- 334. Diferencias sexuales en la acumulación de masa ósea por unidad de masa muscular en humanos. Interpretación biomecánica** J.L.Ferretti, R.F.Capozza, G.R.Cointry, S.L.García, H.Plotkin, María L.Alvarez Filgueira, J.R.Zanchetta.

IDIM/FIM, Bs.As.; CEMFoC, UNR, Rosario; Fac.de Odontología, UBA, y CEME, Santa Fe.

El contenido mineral (TBMC, x) y la masa magra (LBM, correlativa con la masa muscular), y densitométricos del cuerpo entero (DXA) se correlacionaron ( $p<.001$ ) a pendiente constante de 52 g/kg en 446 varones y 645 mujeres de 2 a 83 años. Las curvas coincidieron para niños y niñas, separándose tras la pubertad a una distancia constante de +130 g de BMC para los hombres y de +650 g para las mujeres menstruantes respecto de los niños y niñas ( $p<.001$ ). En las mujeres postmenopáusicas el TBMC fue intermedio entre el de las premenopáusicas y el de los hombres de igual LBM. El cociente TBMC/LBM, similar en niños y niñas, creció en las mujeres respecto de los hombres de igual edad hasta la menopausia ( $p<.001$ ); luego ambos sexos se igualaron. Esto sugiere que la masa ósea está determinada por la masa muscular durante toda la vida, en forma similar en niños y niñas; pero que durante la vida sexual se acumula más hueso por unidad de masa muscular, con diferencia a favor de las mujeres hasta la menopausia. Esta ventaja (conveniente a los fines reproductivos), se expli-

caría por acción de las hormonas sexuales sobre los umbrales mecanostáticos de disparo alternativo de la remodelación en modo «conservación» (bajo turnover, balance neutro de los pozos) o «desuso» (alto turnover, balance negativo).

- 335. La administración de monofluorofosfato (MFP) está asociada con la aparición extracelular de fluor (F) ligado a proteínas y péptidos.** M. Morosano, Ana Masoni, A. Rigalli, Laura Pera, L. Esteban, R. C. Puche.

Laboratorio de Biología Osea, Facultad de Medicina, Rosario.

La BMD de las vértebras lumbares de los pacientes tratados con MFP (15 mg F/día/18 meses) aumenta en  $60\pm15$  mg/cm<sup>2</sup> ( $P<0.001$ ). En ayunas, las fluoremias son  $5.0\pm0.7$  mM ( $n=16$ ) (controles  $1.4\pm0.6$  μM,  $n=30$ ,  $P<0.001$ ). La fracción difusible fué  $0.6\pm0.3$  μM, compuesta por partes iguales de fluoruro y F ligado a péptido/s de peso molecular 2800±700 Da. La fracción difusible de los controles ( $0.4\pm0.2$  μM) contiene solamente fluoruro. Aumentos semejantes de masa ósea lumbar se observan con NaF (30 mg F/día) pero asociados con fluoremias difusibles de 3 a 6 μM. Estos resultados obligan a replantear el significado biológico del F ligado a las proteínas que aparece cuando el MFP se combina irreversiblemente con α2-macroglobulina y C3. Estas proteínas se inactivan e hidrolizan progresivamente por proteasas (hígado, hueso), originando péptidos con F de aprox. 2800 Da. La matriz ósea de ratas tratadas con MFP contiene F ligado a péptido/s de 2800 Da (3 a 4 mmoles de F por fémur), muy probablemente semejantes a los del plasma. La fracción extracelular de F no iónico, ligado a proteínas o péptidos actúa como reservorio del anión que prolonga la exposición de los osteoblastos al fluoruro y contribuye a explicar la mayor biodisponibilidad del flúor del MFP respecto del NaF.

- 336. Estudio histomorfométrico, tomográfico y biomecánico de los efectos de la hPTH(1-38) y el risedronato sobre el hueso cortical de rata inmovilizado.** R.F.Capozza, Rosa M.Alippi, Yan Fei Ma, W.S.S.Jee, J.L.Ferretti.

CEMFoC, UNR, Rosario; Fac.de Odontología, UBA; IDIM/FIM, Bs.As.; Radiobiol.Div., Univ.of Utah, USA.

Ratas con una pata trasera inmovilizada (IM) recibieron 0 (IMc) ó 200 ug/kg/d sc de hPTH(1-38) por 75 días (P), seguidos de 0 (PW) ó 5 ug/kg sc 2/sem de risedronato (PR) por otros 60 días, o sólo el risedronato (R). Las metáfisis tibiales IM se estudiaron histomorfométricamente. Las diáfisis femorales IM se escanearon por pQCT y se ensayaron en flexión. La hPTH mejoró el área, el ancho medio, los perímetros perióstico y endóstico, el cociente entre éstos (índice de robusticidad ósea), el momento de inercia, la densidad volumétrica y el módulo elástico (E) del hueso cortical ( $p<0.05-p<0.01$ ). Estos efectos, correlativos con la calidad mecánica diafisaria, se mantuvieron en PW y persistieron o aumentaron en PR. Las curvas de «distribución/calidad» - correlaciones entre indicadores arquitectónicos (y) y de calidad mate-

rial (x) - fueron siempre «catabólicas» para IMc respecto del control intacto (falta de respuesta modelatoria por desuso) y «anabólicas» para P, PW y PR, mostrando propiedades arquitectónicas supermormales pese a la falta de estímulo mecánico de las patas. El risedronato sólo no produjo efectos. La hPTH(1-38) evitó el deterioro cortical por IM, y el risedronato mantuvo o mejoró ese efecto, pese a la falta de estímulo mecánico; sin embargo, el impacto sobre la calidad mecánica ósea fue menor que el observado antes en las patas contralaterales sobrecargadas.

337.

**Regulación de la expresión del ARNm de galanina (GAL) en el hipotálamo de ratas con inducción del apetito salino por desoxicorticosteroна (DOCA).** Claudia Grillo, G. Pirolí, Mónica Ferrini, Flavia Saravia, Paulina Roig, A.F. De Nicola.

*IBYME-CONICET. Depto. Bioquímica Humana. Facultad de Medicina. UBA, Buenos Aires.*

GAL se colocaliza con arginina-vasopresina (AVP) en las neuronas magnocelulares de los núcleos paraventricular (PVN) y supraóptico. El objetivo de este trabajo fue estudiar si DOCA modula la expresión de GAL como lo hace con AVP. Para ello utilizamos tres grupos ratas macho intactas: (a) controles que recibieron vehículo (CONT), (b) tratadas con 4 inyecciones de 10mg DOCA/animal/día, en días alternados (DOCA 4i), este tratamiento induce el apetito salino sin provocar hipertensión, y (c) tratadas con 9 inyecciones de DOCA (DOCA 9i), lo que produce hipertensión. El ARNm de GAL se determinó por hibridización in situ. En los grupos DOCA 4i y DOCA 9i se observó incremento en el número de granos/célula del PVN (ANOVA,  $p<0.001$ , CONT:  $33.0\pm2.6$ ; DOCA 4i:  $82.5\pm6.0$ ; DOCA 9i:  $77.2\pm8.0$ ). En una segunda serie de experimentos, controles y DOCA 4i bebieron solamente agua o NaCl al 3%. La ingesta de solución salina incrementó el ARNm de GAL en CONT y en DOCA 4i, con respecto a los que sólo bebieron agua (ANOVA,  $p<0.001$ ; CONT-agua:  $45.5\pm3.3$ , CONT-sal:  $75.8\pm3.6$ , DOCA-agua:  $55.4\pm3.4$ , DOCA-sal:  $87.2\pm7$ ). Conclusión: los aumentos del ARNm de GAL se deben al consumo de sal estimulado por DOCA o a la oferta de solución salina como única bebida. Esto concuerda con datos previos del ARNm de AVP. Debido a que el tratamiento combinado de DOCA y sal produce hiperexpresión de ambos mensajeros, sugerimos que AVP y GAL podrían ser blanco de los efectos centrales de los mineralocorticoïdes.

**338. Tratamiento con RU 38846 (RU) en ratas diabéticas sobre la potenciación por el estrés oxidativo de las alteraciones mitocondriales.** J.A Brignone, C.M.C. de Brignone, R.C. Ricci, I.R.R. de Mignone, M.C. Susemihl, E. Ashkar, R.R. Rodríguez.

*Dto. de Bioquímica y Dto. de Fisiología. Facultad de Medicina. UBA, Buenos Aires.*

El estrés oxidativo es causa de lesiones celulares irreversibles, por ello se estudió la acción "in vivo" de la hiperbaria a 2 ATA de oxígeno. Se consideraron grupos de ratas: normal(N), diabético(D), diabético adrenalectomizado(D+ADX) y tres grupos fueron tratados con dosis crecientes de RU(D+RU). Una parte de cada grupo fue inmerso(i) en cámara hiperbárica y otro fuera de la misma(f). Se midieron los siguientes parámetros: a) consumo de oxígeno(cons.O<sub>2</sub>) con succinato como sustrato

(polarográficamente) b) actividades de las enzimas: 3-hidroxibutirato deshidrogenasa(HBD) y citocromo c oxidasa(cito. c oxid)(espectrofotométricamente). Se demostró que el grupo D(i) disminuyó significativamente el cons.O<sub>2</sub> vs D(f) ( $p < 0.01$ ) mientras que el D+ADX(i) vs D+ADX(f) fué NS. Las variaciones de las actividades HBD y cito. c oxid, producidas por la diabetes, fueron potenciadas por el estrés oxidativo. Así la HBD y cito. c oxid. de D(i) vs D(f) fueron  $p < 0.01$ . En cambio D+ADX(i) vs D+ADX(f) fue NS. Dosis crecientes de RU demostraron en D+RU asociación dosis-efecto protector sobre la potenciación por hiperbaria de alteraciones del cons.O<sub>2</sub> (con índice  $r=0.82$ ) y actividades HBD ( $r=0.97$ ) y cito. c oxid ( $r=0.99$ ). Se concluye que la falta o disminución de glucocorticoides en tejidos impide la potenciación, por hiperbaria, de dichas alteraciones.

**339. Relación entre hiperglucemia y alteraciones cristalinianas en ratas diabéticas eSMT y eSS.** Fernanda Toniolo, Silvana Montenegro, María C Tarrés, Stella Martínez, A Naves.

*Cátedra de Biología, Facultad de Cs Médicas, UNR, CIUNR e Inst de Histopatología, Rosario.*

Las ratas diabéticas eSS muestran disminución de células en el epitelio subcapsular anterior cristaliniano en relación con la edad y la duración e intensidad de la hiperglucemia. Se estudiaron 9 machos eSS, 10 de la línea eSMT derivada de la anterior y 10 controles α. A los 6 y 12 meses se midió glucemia basal (G0) y tras sobrecarga (G120). La glucemia (mg/dl) fue superior en eSMT seguida de eSS registrándose los menores valores en α (6 m: G0:  $139\pm38$ ,  $104\pm20$ ,  $71\pm8$ ,  $p < 0.001$ . G120:  $279\pm91$ ,  $213\pm44$ ,  $143\pm28$ ,  $p < 0.01$ . 12 m: G0:  $279\pm134$ ,  $92\pm8$ ,  $72\pm23$ ,  $p < 0.001$ . G120:  $418\pm92$ ,  $304\pm88$ ,  $168\pm38$ ,  $p < 0.001$ ). El número de células del epitelio subcapsular anterior del cristalino por  $200\mu$  lineales de cápsula (necropsia al año de edad) fue menor en eSMT ( $11.1\pm1.5$ ,  $18.6\pm0.5$ ,  $20.5\pm0.8$ ,  $p < 0.001$ ). Seis animales eSMT mostraron cataratas corticales completas y el resto tuvo lesiones poco extensas semejantes a las de eSS. La perdida de células descripta en el endotelio corneano donde los elementos remanentes aumentan su superficie para cubrir los espacios, se ha relacionado con envejecimiento y se acelera por la diabetes. De forma similar, la morfología del epitelio subcapsular anterior cristaliniano de eSMT con reducción de núcleos y citoplasmas aplanados, podría interpretarse como un envejecimiento acelerado respecto de eSS, debido a una exposición más temprana a hiperglucemias intensas.

**340. Modificaciones de la filtración glomerular por la insulina.** Verónica Di Loreto, R. C. Puche, Martha E. Locatto.

*Laboratorio de Biología Osea, Facultad de Medicina, Rosario.*

Este trabajo analiza la relación entre la insulinemia y clearance de inulina, (estimador de GFR), en ratas controles (C) y diabéticas (D) por aloxano. Tres semanas post inyección de aloxano, (ip, 20 mg/100 g), la GFR presentó amplio rango de valores: un tercio de los cuales fué mayor que el de los controles. (D:  $0.79\pm0.14$  ml/min,  $n=8$ ; C:  $0.49\pm0.07$ ,  $n=17$ ;  $p < 0.01$ ). Aunque la GFR se correlaciona con el tamaño renal ( $r=0.72$ ,  $P < 0.01$ ), la GFR se redujo quince minutos después de inyectar insulina (2U/100 g de peso). El efecto de la insulina endógena se comprobó

perfundiendo ratas D (que conservan restos de páncreas funcional) y C con solución 0,28 M de glucosa. Las modificaciones (respecto de los niveles basales) en la insulínemía (RIA) y en la GFR fueron mayores en C ( $17.2 \pm 3.25$  mUI/l y  $-0.78 \pm 0.07$  ml/min, n=12) que en D, ( $6.0 \pm 1.8$  mUI/l,  $0.41 \pm 0.09$  ml/min, n=22; p<0.01). La sensibilidad a la insulina endógena fué mayor en la D (I/GFR: D=0.069 ml/min<sup>-1</sup>/mUI ml<sup>-1</sup>, C=0.046). Conclusiones: La insulina reduce la GFR en ratas C y D. Las ratas D son más sensibles que las controladas.

- 341. Secreción de insulina, insulitis y producción de óxido nítrico en diabetes autoinmune experimental.** Claudia Pastorale, L. Karabatas, E. Dascal, F. Paglieri, H. Chemes, J.C. Basabe.

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

En el ratón, la inyección de múltiples dosis bajas de estreptozotocina (SZ) causa insulitis, destrucción de células  $\beta$  y deficiencia insulínica, precedidas por inflamación no específica de los islotes. Se analizó aparición de insulitis y de alteraciones en: glucemia, secreción de insulina (SI) ante estímulo de glucosa y producción de óxido nítrico (NO) por islotes y células mononucleares de bazo (CMN) en ratones C57BL/KsJ machos que recibieron 5 inyecciones de 40 mg/Kg de SZ. Los ratones se sacrificaron a los 6, 9, 12 y 16 días post-lera inyección. Los resultados muestran un aumento significativo de la glucemia ( $186 \pm 8$  vs  $455 \pm 52$  mg/dl) y disminuciones significativas en ambas fases de SI (1era fase: SZ:  $4.90 \pm 0.59$  vs citrato:  $8.08 \pm 0.26$   $\mu$ U/5 min/islo; 2da fase: SZ:  $111.45 \pm 5.23$  vs citrato:  $137.94 \pm 4.56$   $\mu$ U/32 min/islo) a partir del día 9 post-SZ. Con respecto a la producción de NO se observó: a) en los islotes: un aumento significativo al día 9 (p<0.01); b) en CMN: aumentos significativos a partir del día 6 (p<0.01 en todos los casos). El estudio histológico mostró insulitis progresiva a partir del día 9. Los resultados mostrados sugieren un deterioro temporal en el mecanismo de SI que se hace manifiesto a partir del 9º día después del inicio del tratamiento y se correlaciona con producción aumentada de NO en los islotes y aparición de insulitis de severidad creciente.

- 342. Comportamiento de la calicreinas activas(Ca) en retina de ratas diabéticas(DBT).** Sandra.Hope, M G Marina Prendes, H Benítez, Ch Astudilla, O Catanzaro.

Cátedra de Fisiología. FFyB. UBA. PROSIVAD-CONICET. Buenos Aires.

Las calicreinas contribuyen a la regulación del flujo sanguíneo, y la complicación vascular más común de la Diabetes Mellitus es la retinopatía, que se ve influenciada por trastornos endocrinos, metabólicos, por el tiempo de evolución. Nuestro objetivo fue evaluar el comportamiento de éstas serinoproteasas en retinas de ratas DBT. Para ello se inyectaron ratas Wistar hembras de 8 meses de edad, con estreptozotocina (60 mg/Kg pesos), con lo que desarrollaron DBT cetogénicas. Se las caracterizó con glucemias basales (Gb). A un grupo (DBT+I) se le instauró tratamiento de insulina de depósito (1.5 U/ 100gr de pesos) y a otro no(DBT). Al 7º día se enuclearon los ojos de todos los grupos y se separó la parte posterior (retina, epitelio pigmentario y coroides). Se homogeneizó el tejido con buffer Tris, luego se centrifugó a 4º C. El sobrenadante se pasó por Sephadex. En el homogéniato resul-

tante se determinó la Ca. Las determinaciones realizadas fueron: 1 Pesos retinianos y corporales. 2 Glucemias. 3 Actividad de Calicreinas con substrato (S2266), en el homogéniato. Algunos de los resultados fueron: (DBT-DBT+I-C) 2-Gb(mg/dl):  $320.5 \pm 7.9$  -  $141 \pm 26$  -  $93 \pm 5$ . 3-Ca( $\mu$ moles PNA/100mg de tejidos):  $0.2097 \pm 0.0032$  -  $0.1982 \pm 0.00824$  -  $0.5336 \pm 0.1019$ . Se concluyó: 1 Existe actividad de calicreinas en el tejido retiniano. 2 La actividad de calicreinas en retinas diabéticas es reducida respecto a la de animales controles.

- 343. Estudio histomorfométrico del fémur de ratones con diferente masa ósea máxima.** E. Roggero, Daniela Mana, Evelyn van Brussel, R. Di Masso, María T. Font, Lucila Hinrichsen.

Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, U.N.R, Rosario.

En roedores, la selección por peso corporal produce cambios concomitantes en caracteres relacionados, como tamaño y masa del esqueleto. El efecto de la selección divergente por conformación corporal del adulto se evaluó en la histomorfometría femoral a los 21 y 42 días de edad en líneas de ratones seleccionadas a favor (CBi+, CBi-) o en contra (CBi/C, CBi/L) de la correlación fenotípica entre peso corporal y longitud caudal. Se utilizaron 6 machos y 6 hembras de cada línea y de la testigo no seleccionada CBi. Se extirpó el fémur, se determinó su longitud (LF, mm) y se midieron la altura del cartílago de crecimiento y las áreas (mm<sup>2</sup>) total y medular de la diáfisis con un analizador de imágenes. Se calculó la altura relativa de la placa epifisaria (ARPE) (longitud de la placa por unidad de longitud del fémur) y el índice de espesor cortical (IEC) (área cortical por unidad de área de la diáfisis), que estiman el crecimiento y la densidad ósea femoral, respectivamente. Los datos se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis. En ambas edades hubo diferencias significativas (p<0.01), atribuibles al genotipo. CBi+ mostró los mayores LF (media $\pm$ ES) (21:11.2 $\pm$ 0.3; 42:14.3 $\pm$ 0.1) y ARPE (21:49.8 $\pm$ 3.8; 42:47.8 $\pm$ 4.1), y CBi- los menores (LF 21:9.8 $\pm$ 0.2, 42:13.1 $\pm$ 0.1; ARPE 21:34.9 $\pm$ 3.0, 42:23.7 $\pm$ 2.2). IEC fue más pequeño en CBi/L (21:31.6 $\pm$ 2.5, 42:37.7 $\pm$ 1.7) que en /C (21:42.8 $\pm$ 3.1, 42:52.9 $\pm$ 2.8). Los ratones armónicamente grandes (CBi+) o pequeños (CBi-) se diferenciaron en su capacidad de crecimiento. Por el contrario, los seleccionados antagónicamente (CBi/L y CBi/C) modificaron su densidad ósea, probablemente a causa de una demanda biomecánica distinta, ya que /L, de peso corporal bajo y esqueleto largo, sustenta una biomasa comparativamente pequeña.

- 344. Efecto de dos bisfosfonatos sobre la unión de VDR proveniente de cultivos celulares a los VDRE de los genes de osteocalcina y parathormona.** Irina Mathov<sup>1</sup>, Lilian Plotkin<sup>1</sup>, Cecilia Sgarlata<sup>1</sup>, H. Otero<sup>1</sup>, C. Bogado<sup>2</sup>, E. Roldán<sup>3</sup> y Juliana Leoni<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>IDEHU-Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA), <sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Metabólicas, y <sup>3</sup>Laboratorios Gador, Buenos Aires.

Los bisfosfonatos son análogos del pirofosfato que contienen un grupo P-C-P en su estructura. Actúan como inhibidores de la resorción ósea, a diferencia de la vitamina D que la estimula. Su mecanismo de acción no ha sido completamente dilucidado. Se

ha estudiado exhaustivamente su efecto sobre los osteoclastos, pero no está claro como actúan sobre células de lineaje osteoblástico. Con el fin de estudiar el mecanismo de acción sobre osteoblastos, se analizó el efecto de dos bisfosfonatos: (1-hidroxietiliden)-bis-fosfonato (Etidronato) y (3-amino-1-hidroxipropiliden)-bis-fosfonato (Pamidronato) sobre una línea celular osteoblasto-símil, ROS 17/2.8. Las células fueron cultivadas en presencia de cada uno de los bisfosfonatos en una concentración  $10^{-6}$  M y en presencia de vitamina 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ( $10^{-8}$  M). A partir de las células cultivadas en presencia de los diferentes agentes, se obtuvieron extractos nucleares. La presencia del receptor de vitamina D (VDR) en los extractos nucleares fue puesta en evidencia mediante Western Blot. Se determinó la interacción del VDR con dos oligonucleótidos sintéticos marcados con [<sup>32</sup>P]dATP, correspondientes a los elementos respondedores a Vitamina D (VDREs) presentes en los genes de parathormona y osteocalcina, mediante ensayos de EMSA. Se determinó que la presencia de bisfosfonatos en el medio de cultivo aumenta la unión del VDR al oligonucleótido correspondiente al VDRE presente en el gen de parathormona y disminuye la unión al de la osteocalcina.

- 345. Las mujeres menstruantes acumulan mineral óseo por unidad de masa muscular en regiones esqueléticas mecánicamente poco relevantes.**  
J.L.Ferretti, R.F.Capozza, G.R.Cointry, M.D.Meta, P.Schneider, C.Reiners.

CEMFoC, UNR, Rosario; Fac.de Odontología, UBA, Buenos Aires, Univ. Würzburg, Alemania.

Para verificar esta hipótesis, determinamos el contenido y la densidad mineral volumétricos de la región trabecular (vTbBMC, vTbBMD), y el área y el momento de inercia (MI, indicador de la eficiencia mecánica del diseño que crece con la perifericidad del material) de la región cortical, en scans obtenidos por QCT periférica (pQCT) del radio distal en 155 hombres y 265 mujeres adultos normales apareados por edad. Las curvas de correlación entre vTbBMD (y) y TbBMC (x;  $p<.001$  ambas) mostraron mayor altura y pendiente en las mujeres. Las correlaciones entre MI (y) y área de la región cortical (x) mostraron mayor altura y pendiente en los hombres (ANCOVA, siempre  $p<.001$ ). Esto indica que, en las mujeres, a) masas equivalentes de hueso trabecular (poco relevante para el MI) se distribuyen en áreas más pequeñas (tienden a condensarse más), y b) para una misma eficiencia arquitectónica cortical, se acumula más material que en los hombres. Eso sólo puede ocurrir si el material se acumula del lado endóstico, donde menos aporta al MI. Los resultados confirman la hipótesis. Los estrógenos tornarían más «conservativa» la remodelación (bajo turnover, balance neutro de pozos) por modulación del setpoint mecanostático en regiones yuxtamедulares, mecánicamente poco relevantes. Esto mantendría la independencia sexual de la determinación de la calidad ósea por la fuerza muscular regional, pese al incremento relativo de masa en mujeres.

- 346. El alendronato (AHBP) mejora la estructura y la calidad mecánica vertebral en ratas ovariectomizadas jóvenes sólo a dosis altas.**  
María A.Chiappe, G.Iorio, E.Alvarez, Margarita D.Meta, G.R.Cointry, R.F.Capozza, J.R.Zanchetta, Lis Mosekilde, J.L.Ferretti.

Facs.de Veterinaria y de Odontología, UBA; CEMFoC, UNR, Rosario, y Univ.of Aarhus, Dinamarca.

Tras ovariectomía peripuberal (OX), grupos de 13-15 ratas recibieron 0 (OXc), 5 ó 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de AHBP sc 2/sem por 6 meses, dejándose un grupo sham. Sus cuerpos vertebrales fueron escaneados al SEM (L2), calcinados (L3), o ensayados a la compresión (L4). Notablemente, ni la OX ni la dosis de 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  modificaron la estructura, composición o calidad mecánica vertebral. La dosis de 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , en cambio, mejoró el contenido y la concentración de cenizas, la robustez de la estructura trabecular y cortical al SEM, la rigidez estructural, la resistencia a la fractura (en valores crudos, no ajustados a contenido en cenizas), y la absorción de energía por unidad de deformación, por sobre ambos controles ( $p<0.01-p<0.001$ ). Las mejoras de calidad mecánica vertebral correlacionaron con la concentración de cenizas ( $p<0.01$ ). Las curvas de «distribución/calidad» - correlaciones entre calidad arquitectónica (y) y material (x) - mostraron la naturaleza anticatabólica de esos efectos. Este diseño, pese a haber mostrado anteriores efectos sobre la diáfisis femoral a ambas dosis, sólo lo hizo ahora para la dosis mayor, en congruencia con las recomendaciones (FDA, USA) de utilizar dosis altas de bisfosfonatos (y animales más viejos) para estudios vertebrales. El resultado apoya la eficacia del AHBP para mejorar la calidad vertebral en estados estrógenopivos a dosis adecuadas.

- 347. La glicosilación no enzimática (glicación) de la Fosfatasa Alcalina modifica su bioactividad.**  
'McCarthy AD, 'Cortizo AM, 'Bruzzone L, 'Giménez Segura G, y 'Etcheverry SB.

<sup>1</sup>Cátedra de Bioquímica Patológica, y <sup>2</sup>División Química Analítica, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. La Plata.

En pacientes diabéticos mal compensados, la hiperglucemia induce un aumento en la glicación de diferentes proteínas. La fosfatasa alcalina (FAlc) es una exoenzima anclada a la membrana plasmática, expuesta al compartimiento extracelular. En este trabajo, se determinó el efecto de la glicación *in vitro* de la FArc sobre algunas de sus características estructurales y funcionales. Se incubó la enzima con diferentes concentraciones de varios azúcares por distintos períodos de tiempo. Una disminución en la actividad específica de la FArc, dependiente del tiempo de incubación y de la concentración y potencia glicosilante del azúcar empleado, se correlacionó con un aumento en los niveles de los productos de glicación temprana o de Amadori, y con la aparición de la fluorescencia característica de los productos de glicación avanzados (PGA). No se observaron cambios en los pesos moleculares de las muestras al ser separadas por SDS-PAGE. Sin embargo, la movilidad electroforética de la banda de FArc sobre acetato de celulosa en medio alcalino, aumentó en función del tiempo de incubación y de la potencia glicosilante del azúcar utilizado. Estos resultados sugieren que: a) bajo condiciones *in vitro*, la glicación de la FArc provoca alteraciones en su estructura y actividad; b) algunos de los residuos de aminoácidos glicosilados *in vitro* podrían ser importantes en el sitio activo de la FArc.

- 348. Productos de glicación avanzada de proteínas: Efectos sobre el crecimiento de osteoblastos en cultivo.** 'McCarthy AD, 'Etcheverry SB, <sup>2</sup>Bruzzone

L, y 'Cortizo AM.

<sup>1</sup>Cátedra de Bioquímica Patológica, y<sup>2</sup>División Química Analítica, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. La Plata.

La hiperglucemia crónica observada en pacientes con Diabetes mellitus mal compensada, provoca un aumento en los niveles tisulares de productos de glicosilación no enzimática avanzada (PGA). En varios tipos celulares se han encontrado receptores específicos para los PGA, que han sido implicados en el desarrollo de las complicaciones crónicas de la Diabetes. En este trabajo, estudiamos las alteraciones que producen los PGA de albúmina sérica bovina (ASB), obtenidos *in vitro*, sobre el crecimiento de MC3T3E1, una línea de osteoblastos de ratón, y UMR106, células derivadas de un osteosarcoma de rata. La incubación con PGA-ASB produjo, a tiempos cortos, un aumento en la proliferación y diferenciación celular, respecto del control (células incubadas con ASB). Luego de una incubación prolongada con PGA-ASB, se observó una depresión significativa en ambos parámetros del crecimiento celular. La búsqueda de receptores celulares para los PGA, por medio de estudios de desplazamiento competitivo, permitió el hallazgo de un sólo tipo de sitios, saturables, y con una afinidad y densidad celular similar a los de otros tipos celulares. Nuestros resultados muestran que los PGA ejercen efectos directos sobre el crecimiento de osteoblastos en cultivo. Estos efectos podrían ocurrir por mecanismos desencadenados por la ocupación del receptor para PGA encontrado en estas células.

**349. La determinación de la calidad ósea radial humana por la fuerza muscular regional es independiente del sexo y del estado estrogénico.** J.L. Ferretti, R.F. Capozza, G.R. Country, G.T. Niemeyer, J.Willnecker, H.Schiessl.

CEMFoC, UNR, Rosario; Stratec Medizintechnik, Pforzheim, Alemania.

Las mujeres premenopáusicas acumulan más mineral óseo por unidad de masa muscular que los hombres, presumiblemente en regiones mecánicamente poco relevantes, sin interferir la interrelación músculo/hueso. Para verificarlo, correlacionamos el momento dinamométrico máximo de flexión del antebrazo (x) con un índice de resistencia ósea (SSI = momento de inercia x densidad mineral volumétrica cortical, calculados en scans radiales metáfisis y diafisis por pQCT, y) en 42 varones, 8 mujeres premenopáusicas y 9 postmenopáusicas, normales, de 17 a 75 años. Ni las pendientes ni las ordenadas al origen de las correlaciones (siempre lineales) variaron estadísticamente (ANCOVA), sea analizando varones sólos, varones más mujeres premenopáusicas, o todos los grupos juntos, tanto en metáfisis ( $y=23.5 \pm 6.7x$ ;  $y=23.3 \pm 6.7x$ ;  $y=24.7 \pm 6.8x$ ) como en diafisis ( $y=90.2 \pm 3.5x$ ;  $y=108.4 \pm 3.3x$ ;  $y=93.1 \pm 3.4x$ ). El ajuste lineal para los 3 grupos juntos fue alto ( $R^2=0.81/0.88$ ,  $p<.001$ ) a lo largo de un rango de fuerza de 2.5/12 Kgm. Esto confirma la determinación de la calidad ósea por la fuerza muscular regional, y su independencia del sexo y del estado estrogénico. La acumulación de hueso (supuestamente normal) en mujeres menstruantes no mejoría su calidad mecánica radial respecto de la de postmenopáusicas u hombres con igual fuerza muscular, porque no afectaría la interacción mecanostática musculoesquelética propia de la especie.

**350. Modulación de la actividad de la 11 $\beta$ Hidroxisteroide Deshidrogenasa-2 renal en condiciones de estrés.** María del Pilar Igarreta\*, C.P. Lantos\*, J.C. Calvo\* y M.C. Damasco\*.

\*PRHOM, CONICET, Departamento Qca. Biológica, FCEyN, UBA, Pab. 2, \*IBYME, Buenos Aires.

La 11 $\beta$ HSD2, que cataliza el pasaje de corticosterona (activa) a 11-dehidrocorticosterona (inactiva), permite una mejor unión de aldosterona a los receptores tipo I renales. Estudiamos el efecto del estrés provocado por: a) colocación de una sonda (G2), b) gravige de NaCl 0,45% (G3) y c) gravige de HCl 200 mM (G4) sobre la cinética de la enzima microsomal renal en ratas intactas. Animales no tratados (G1) se usaron como controles. Método: Los microsomas se incubaron con [<sup>3</sup>H]corticosterona y corticosterona fría en varias concentraciones, NAD 400  $\mu$ M, a pH 7,4 durante 5 min. Las muestras fueron extraídas con acetato de etilo y analizadas por TLC. Resultados: V<sub>max</sub> para G2\* ( $10.04 \pm 0.16$ ), G3\* ( $9.16 \pm 0.74$ ), G4\* ( $10.19 \pm 0.79$ ) y G1 ( $4.82 \pm 0.67$ ) pmoles/min/mg prot. Km para G2\* ( $50.72 \pm 7.05$ ), G3\* ( $55.25 \pm 8.37$ ), G4 ( $27.40 \pm 3.20$ ) y G1 ( $22.37 \pm 2.42$ ). \* $p<0.05$  respecto de G1. Conclusión: El estrés experimental modifica la V<sub>max</sub> y el Km de la enzima. Se discutirá si estos cambios se deben a los glucocorticoides circulantes.

**351. Interacción entre epitelio mamario y preadipocitos 3T3-L1.** Marcela Sandoval, C. Zizola, C. Molinari, J.C. Calvo.

IBYME, Buenos Aires.

Es bien conocida la interrelación existente entre el epitelio mamario y el estroma fibroblástico/adiposo en la glándula mamaria, especialmente durante la embriogénesis. En el animal adulto, el ciclo ovárico, la preñez y la lactación van acompañados de profundos cambios en la relación parénquima/estroma. Nosotros diseñamos sistemas de co-cultivo entre células epiteliales mamarias y preadipocitos de ratón ya sea por combinación de ambos tipos celulares en la misma cápsula o mediante el uso de "inserts", donde ambos tipos celulares se encuentran separados por una membrana permeable cubierta por Matrigel. Al microscopio hemos podido observar cambios en la proliferación de las células epiteliales debidos a la presencia de los fibroblastos, con formación de estructuras tipo "domos" o "islas" segregadas de los fibroblastos. En la dirección epitelio a fibroblastos, el efecto observado consistió en la inhibición de la acumulación de triglicéridos por los preadipocitos, evidenciada por una menor coloración con Oil Red O que, específicamente, se une a lípidos. Pudo observarse que esta inhibición era proporcional al número de "inserts", conteniendo células epiteliales, que se colocaba sobre los adipocitos creciendo sobre plástico. Estos resultados indican que ambos tipos celulares se comunican regulando su proliferación y/o diferenciación.

**352. Expresión del sistema calicreína-cinina en ratas diabéticas preñadas.** María Gabriela Marina Prendes, S. Hope, C. Astudilla, A. Loria, C. Catanzaro.

Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y

*Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, PROSIVAD-CONICET, Buenos Aires.*

El cuadro diabético puede cursar con nefropatía y retinopatía. En el caso particular de la preñez, debemos considerar un nuevo sistema: el placentario. El objetivo de nuestro trabajo fué relacionar la actividad renal y placentaria del sistema calicreína-cinina (CA), en ratas diabéticas. Se emplearon ratas Wistar hembras, las cuales fueron inyectadas con streptozotocina (100 mg/kg de peso corporal) a los dos días de nacidas, presentando de adultas una disminución del número de células B pancreáticas de alrededor del 25%, y un defecto crónico en el mecanismo glucosa-sensible de liberación de insulina, sin necesidad de la administración de la misma (diabetes tipo II). A los 85 días de edad se caracterizaron por medio del test de tolerancia oral a la glucosa. Los resultados para las ratas diabéticas (DBT) y para las controles (C) fueron (glucemias mg/dl), determinados a tiempo 0, 60, 120 minutos: C- 86.9+/-1.7, 106.8+/-3.4, 79.7+/-1.7. DBT- 123.0+/-8.6\*, 229.5+/-10.0\*, 134.3+/-7.9\*. Ambos grupos de animales se aparearon con machos de la misma cepa y edad. En la tercera semana de preñez se recolectó orina de 24 hs, luego se sacrificaron los animales y se procedió a la disección de las placas. Los valores de CA obtenidos fueron: CA urinarias ( $\mu$ moles PNA/min/g de peso corporal) C- 60.9+/-3.4, DBT- 48.8+/-2.4\*, CA placentarias ( $\mu$ moles PNA/100 mg placa) C- 0.78+/-0.05, DBT- 1.28+/-0.07\*. \* C vs DBT  $p < 0.05$  significativo.

**353. Modificaciones en la glucemia e insulinemia causada por el ayuno y dietas aproteinas antes y después de su realimentación.** O Ponzo, MA Cresta, D Rondina, B Szwarcfarb, S Carbone, JA Mogilevsky, JC Basabe, P Scacchi.

*Dept de Fisiología, Fac Medicina, UBA. CEDIE, Hosp de Niños, Buenos Aires.*

Es sabido que el ayuno (Ay) y la dieta aproteica (Apr) producen descenso de la actividad del eje gonadal y la insulina eleva la secreción de LH-RH. La realimentación eleva los niveles de gonadotrofinas por encima de los controles. Con el fin de conocer la posible relación entre parámetros metabólicos y el descenso de gonadotrofinas, estudiamos los niveles de glucosa (G) y de Insulina (Ins) en sangre de ratas macho adultas en los siguientes grupos: a) Control (n=6), b) Ayuno de 7 días (n=16), c) Dieta aproteica durante 21 días (n=12). La mitad de los animales de cada grupo fueron sacrificados y el resto realimentados (Re) con dieta normal por 24 hs. Las glucemias (mét. enzimático, mg%) en los Ay desciende y la realimentación los normaliza ( $P < 0.01$ ) (C: 107.0±5.0; Ay: 86.0±5.1; Ay+Re: 122.1±8.6), no modificándose en los Ap. Los valores de Ins (dosados por RIA,  $\mu$ U/ml) mostraron un descenso marcado ( $P < 0.01$ ) en los Ay y Ap (C: 31.2±3.4; Ay: 8.7±1.4 y Ap: 5.7±0.67) y tras la Re los valores en los dos grupos se elevó por encima de los controles (Ay+Re: 50.6±6.6; Ap+Re: 43.5±6.8). La realimentación con una dieta control en animales Ay o Ap, produce en las primeras 24 hs una recuperación de los niveles de Ins. En este mismo esquema dietario, no se produce incremento aún de los bajos niveles de gonadotrofinas (tarda dos semanas). Se sugiere que la Ins podría ser una señal metabólica periférica para la restauración de la función gonadal.

**354. Decondensación de núcleos espermáticos de pacientes infériles en presencia de SDS/DTT.** E. Gaubeca-Klix, C. Marín-Briggiler, M. Cameo, L. Callegano y L. Calvo.

*Biología de la Reproducción y Facultad de Farmacia y Bioquímica, U.B.A, Buenos Aires.*

La decondensación nuclear es el primer cambio que sufre el espermatozoide dentro del ooplasmata. *In vitro*, puede ser inducida por agentes tiorreductores y polianiones; se discute aún si es útil para predecir capacidad fertilizante. El objetivo de este trabajo fue evaluar la decondensación *in vitro*, inducida por SDS/DTT, en un grupo de pacientes infériles. Una alícuota de semen de cada paciente (n=59) se incubó con SDS 1%, DTT 1mM en buffer borato, pH 9 y se determinó el % de formas S (sin cambio), M (moderadamente decondensadas) y G (totalmente decondensadas) a los 5', 15', 30' y 60', al microscopio de contraste de fase. El %M+G aumentó significativamente con el tiempo; a los 60' todos los pacientes presentaron 100% G. El %M+G a los 15' o a los 30' no correlacionó significativamente con concentración, %motilidad, %viabilidad y %formas normales en semen. Se evaluó la cinética de aparición de M para cada paciente: el 45% alcanzó un máximo a los 15' que disminuyó a los 30' para dar origen a G; el 55% restante alcanzó un máximo recién a los 30'. No se encontraron diferencias significativas en los parámetros seminales entre los 2 subgrupos de pacientes. Proponemos que la cinética de aparición de formas M y el %M+G en respuesta a SDS/DTT, al no ser predecibles por parámetros seminales clásicos, podrían ser útiles para evaluar la funcionalidad del espermatozoide.

**355. Mensajeros intracelulares en células de luteomas experimentales.** A Chamson-Reig, O. Pignataro, C. Libertun y V Lux-Lantos.

*IBYME-CONICET, UBA, Buenos Aires.*

El ovario autoimplantado en el bazo de una rata ovariectomizada desarrolla un luteoma estimulado por la hipergonadotrofina. Demostramos que un análogo del GnRH (GnRH-a) suprime el desarrollo tumoral y altera su secreción por efectos a nivel hipofisario y directos sobre el tumor. Se observó además que estos tumores tienen receptores de GnRH, no desensibilizables por el decapéptido. Aquí estudiamos el efecto del análogo de GnRH buserelina (BUS), la prostaglandina F<sub>2</sub>α (PGF<sub>2</sub>α) y el Fluoruro de sodio (FNa; activador de la fosfolipasa C) sobre la inducción de mensajeros intracelulares como la movilización de Ca<sup>2+</sup> y la producción de inositol fosfato en células lúteas provenientes de luteomas y de ovarios controles de hembras prepúberes superovuladas con PMSG y hCG. Las células controles mostraron el aumento clásico de movilización Ca<sup>2+</sup> inducido por Bus (100ng/ml) además de un aumento en el Ca<sup>2+</sup> inducido por hCG (1.10<sup>-9</sup>M) de menor intensidad que el inducido por el análogo. En las células tumorales el Ca<sup>2+</sup> no se modificó ante ningún estímulo. Con respecto al metabolismo de los inositoles fosfato se observó una mayor cantidad de radiactividad asociada a inositoles fosfato (IPs) respecto de [<sup>3</sup>H]inositol (I) en las células tumorales que en los controles (IPs/I: Tumor: 0.046±0.005 vs control: 0.016±0.003, p<0.05). Además, la buserelina estimuló la liberación de los IPs en ambos tejidos pero esta estimulación fue significativamente mayor en los controles que en las células tumorales (% de estimulación: Tumor: 259% vs Control: 544%, p<0.05), no encontrándose diferencias en las estimulaciones inducidas por PGF<sub>2</sub>α (1.10<sup>-9</sup>M) y FNa (1.10<sup>-9</sup>M) entre ambos tipos celulares. Concluimos que la falta de movilización de Ca<sup>2+</sup> inducida por buserelina en las células tumorales podría deberse a una

menor estimulación de los inositoles fosfato sobre los depósitos de calcio intracelulares.

**356. Desarrollo de un tumor experimental de ovario en función del tiempo.** V. Lux-Lantos, A. Chamson-Reig, E. Rey-Roldán, M. Bianchi y C. Libertun.

IBYME-CONICET, UBA, Buenos Aires

El ovario autoimplantado en el bazo de una rata castrada desarrolla un luteoma estimulado por la hipergonadotrofina. Demostramos que un análogo de GnRH suprime el desarrollo tumoral y altera su secreción por efectos a nivel hipofisario y tumoral. Se estudió el desarrollo tumoral a lo largo de un año para evaluar la sobrevida de los animales con tumor, la posibilidad de malignización y los cambios hormonales. Autoinjertamos un ovario en el bazo de hembras castradas (Tumor) y estudiamos su evolución durante un año. Grupo Sham: hembras castradas injertadas con un trozo de músculo en el bazo. A ambos grupos se les tomó muestras de sangre yugular una vez por mes, por la mañana. Se determinó: FSH, LH, Progesterona (P) y Estradiol ( $E_2$ ) séricas. Se cuantificó el volumen del tumor y la posible propagación metastásica. Al cabo del año no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de mortalidad entre ambos grupos [Sham 14% (n:14) vs Tumor 20% (n:20). El volumen de los tumores fue entre 0.5 y 9.0 cm<sup>3</sup>. No se observaron focos de propagación metastásica. En el grupo Sham, FSH aumenta y se mantiene elevada hasta finalizado el año. A partir del 5 mes en el grupo Tumor disminuye FSH, manteniéndose luego los niveles bajos [FSH (ng/ml): mes 6: Tumor: 19.76±2.66 (n:17) vs Sham: 38.38±6.56 (n:13) p<0.05]. La secreción de LH está elevada en ambos grupos, con una tendencia a disminuir en el grupo Tumor a partir del mes 4. No se observan diferencias en el  $E_2$  entre ambos grupos. La P en el grupo Tumor no varía a lo largo del año de estudio. En el grupo Sham P aumenta entre los meses 2 y 6. Concluimos que estos luteomas no tienden a malignizarse, ni comprometen la sobrevida. El grupo tumor muestra una marcada caída de FSH a partir del mes 6 que se debería a cambios en el control neuroendocrino en estos animales.

**357. Aumento de la absorción intestinal de monofluor fosfato de sodio (MFP) en la rata, por su asociación con calcio (Ca).** A. Rigalli, Beinlich, A; Puche R.C.

Laboratorio de Biología Ósea, Facultad de Medicina, Rosario

El objetivo de este trabajo fue investigar si la absorción de MFP es modificada por su asociación con Ca. Se midieron las tasas de absorción e hidrólisis intestinal de MFP, en duodeno de rata aislado *in situ*. Además se determinó el efecto de la presencia de calcio en el intestino sobre la cinética de transferencia de MFP al plasma. En duodeno aislado *in situ*, la tasa de absorción de MFP

en ausencia de Ca no difiere de cero,  $0,006 \pm 0,015 \text{ min}^{-1}$ , n=5. En presencia de Ca (aprox. 80  $\mu\text{M}$ ) la tasa de absorción fue significativamente mayor que cero,  $0,042 \pm 0,016$ , n=5, p<0,025. Este fenómeno se explica por la reducción de la tasa de hidrólisis ( $0,040 \pm 0,009 \text{ min}^{-1}$  n=5 vs.  $0,012 \pm 0,011$  n=5, p<0,05). Como la L-fenilalanina (L-F) es un inhibidor estéreo específico de la fosfatasa alcalina intestinal, se investigó su efecto sobre los efectos mencionados. El agregado de L-F (14 mM) al contenido intestinal reprodujo cualitativamente los efectos del Ca: absorción  $0,023 \pm 0,011 \text{ min}^{-1}$ ; hidrólisis  $0,015 \pm 0,012 \text{ min}^{-1}$ , n=5.. Experimentos adicionales definieron que el Ca es un inhibidor anticompetitivo de la enzima. La concentración máxima de la fluoremia total en ratas intactas que recibieron por sonda gástrica 80  $\mu\text{moles}$  de MFP con Ca, se anticipó respecto de los controles (Con Ca: 90 minutos, controles: 180 minutos). Se concluye que la asociación con calcio aumenta la tasa de absorción del MFP al inhibir la fosfatasa alcalina intestinal y mantener elevada la concentración de MFP en la luz intestinal.

**358. Evaluación neurofisiológica en el Prolapso Genital Recidivado.** O. Contreras Ortiz, R. Gutnisky, A. C. Bertotti, F. Coya Nuñez.

Unidad de Uroginecología, Cirugía Vaginal y Neurofisiología. Hospital de Clínicas "José de San Martín", Buenos Aires. UBA, Buenos Aires.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el daño neurológico en el Prolapso Genital Recidivado (PGR). Se efectuó el registro de los Reflejos Pelvianos, Bulbocavernoso (RBC), Pudendo Profundo (RPP) y Uretopudendo (RUP), como así también Potenciales Evocados (PEC), Pudendos (PEP) y de la unión Uretrovesical (PEUV) a 21 pacientes con Prolapso Genital Recidivado (PGR). Todas ellas fueron tratadas previamente de una a tres veces con cirugía. A todas las pacientes se les realizó una historia clínica uroginecológica, examen físico (pélvico, rectal, vaginal y neurológico) cultivo de orina, pruebas de incontinencia de orina y determinación de orina residual. Se encontró RBC anormal en 14/20 (70%) con una latencia media de 44,65 msec. DS=10,46 RPP anormal en 14/19 (74%) con una latencia media de 44,73 msec DS=9,82 RUP anormal en 2 1/2 (17%) con una latencia media de 51,41 msec. DS PEUV anormal fue encontrado en 6/18 (33%) media  $P_c=80,44$  msec. DS=16,75 y PEP anormales en 6/18 media  $P_c=44,27$  msec. DS=7,71. La anomalidad en los RBC y RPP del piso pelviano fueron los test más frecuentes (85%) en el PGR puntualizando un daño en el nervio pudendo en el PGR. El 33% de las pacientes mostraron una anomalidad funcional en la vía aferente. En dos casos con PE anormales asociados con reflejos pelvianos normales, se presume una alteración subclínica supraconal. Los resultados encontrados confirman la presencia de deterioro de la función neuromuscular del piso pelviano en el PGR y abre nuevas perspectivas en el diagnóstico de las disfunciones del piso pelviano.

## Otras Actividades Desarrolladas Durante la XLII Reunión Anual de la SAIC

### CONFERENCIAS

- **CONFERENCIA LANARI:**

"Sobrevida prolongada libre de síntomas en la infección por HIV. Convivir con el enemigo".  
 Dra. María Marta de Elizalde de Bracco. Subdirectora de Investigación Básica. Instituto de Investigaciones Hematológicas . Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires.

- **CONFERENCIA EN HOMENAJE AL 50° ANIVERSARIO DEL PREMIO NOBEL DEL DR. A. HOUSSAY:**

"Plan futuro de Ciencia y Técnica. Rol del CONICET en el futuro científico Argentino".  
 Dr. Luis Alfredo Beauge. Investigador Superior y Vicepresidente de Asuntos Científicos del CONICET. Buenos Aires

- **CONFERENCIA DE GASTROENTEROLOGIA:**

"Hepatic transport of organic Anions: New and old concepts revisited with bilirubin".  
 Dr. Claudio Tiribelli. Profesor de Bioquímica y Medicina. Centro Studi Fegato. Dipartimento di Biochimica, Biofisica e Chimica delle Macromolecole, Università di Trieste, Italia.

### SIMPOSIOS

#### **SIMPOSIO DE HEMATOLOGIA:**

**TÍTULO:** *Usos terapéuticos de la Eritropoyetina (EPO) recombinante.*

**COORDINADOR:** DR. CARLOS BOZZINI (Profesor Titular de Fisiología, Facultad de Odontología, U.B.A., Investigador Superior del CONICET)

**Paneles:**

DR. CARLOS BOZZINI. *Bases fisiológicas para el uso terapéutico de la EPO.*

DR. PABLO RENDO (Médico Asesor de Biosidus). *Utilizaciones clínicas de la EPO.*

DR. RODOLFO MARTIN (Laboratorio de Riñón, Instituto Lanari) . *EPO: tratamiento de la anemia en la insuficiencia renal crónica.*

DRA. LEONOR STERIN-BORDA (Profesora de Farmacología, Fac. de Medicina, U.B.A., Jefa del Laboratorio de Cardiovascular, CEFYBO, Investigador Principal del CONICET). *Efecto de la EPO sobre órganos no hematopoyéticos. Posible aplicación terapéutica en enfermedades cardíacas.*

#### **SIMPOSIO DE AUTOINMUNIDAD:**

**TÍTULO:** *Diabetes Mellitus y autoinmunidad. Predicción y prevención.*

**COORDINADOR:** DR. EDGARDO POSKUS (Profesor Regular Titular de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, U.B.A., Investigador Principal del CONICET).

**PANELES:**

DR. FELIX E. PUCHULU (Médico Consultor del Hospital de Clínicas "José de San Martín", U.B.A.). *La diabetes mellitus hoy.*

DR. JUAN C. BASABE (Profesional a cargo del Laboratorio de Diabetes Experimental del CEDIE, Hospital de Niños "Dr. Ricardo Gutierrez", Bs.As.). *Diabetes mellitus y autoinmunidad.*

DR. EDGARDO POSKUS. *Los marcadores inmunológicos y la detección precoz de la diabetes mellitus insulinodependiente.*

**SIMPOSIO DE NEUROLOGIA:**

**TÍTULO:** *Aspectos experimentales y clínicos en la Esclerosis Lateral Amiotrófica.*

**COORDINADOR:** DR. ROBERTO SICA (Profesor Titular de Neurobiología, Fac. Medicina, U.B.A.)

**PANELES:**

DR. ALEJANDRO DE NICOLA (Profesor Titular de Química Biológica, Fac. Medicina, U.B.A., Investigador Superior del CONICET). *Efectos hormonales en un modelo murino de Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA).*

DR. OSVALDO UCHITEL (Investigador Principal del CONICET, Prof. Adjunto de Fisiología, U.B.A.). *Los canales de calcio en el terminal motor en la fisiopatología de la ELA.*

DRA. MONICA FISZMAN (Investigador Independiente del CONICET). *Coacción oxidativa: estudios "in vivo" e "in vitro" y su relación con la ELA.*

DR. ROBERTO SICA. *Participación de estructuras nerviosas no motoras en la ELA.*

**SIMPOSIO DE ONCOLOGIA:**

**TÍTULO:** *Angiogénesis, aspectos básicos y clínicos de nuevas terapias biológicas en oncología.*

**COORDINADOR:** DRA. LILIA DAVEL (Jefa de Inmunología Celular, Área de Investigaciones, Instituto "Angel H. Roffo").

**PANELES:**

DRA. LILIA DAVEL. *Angiogénesis en el tratamiento y diagnóstico del cáncer.*

DRA. SLOBODANKA KLEIN (Jefa del Departamento de Bioterio y Cáncer Experimental, Área de Investigaciones, Instituto "Angel H. Roffo"). *Nuevas vacunas en cáncer.*

DR. JOSE MARIA LASTIRI (Médico Oncólogo del Hospital Italiano, Investigador Clínico de Biosidus, Sub-director de la Carrera de Especialistas en Oncología de la U.B.A.). *Aplicaciones clínicas de la biología molecular en oncología.*

**SIMPOSIO DE BIOTECNOLOGIA:**

**TÍTULO:** *Transferencia de la investigación básica al sector tecnológico-industrial.*

**COORDINADOR:** DR. JORGE YANOVSKY (Vicepresidente del Foro Argentino de Biotecnología)

PANELES:

DR. ENRI S. BORDA (Profesor Titular de Farmacología, Fac. Odontología, U.B.A., Investigador Principal del CONICET). *Biología molecular y diagnóstico en enfermedad de Chagas.*

DR. ALUIZIO PRATA (Profesor Medicina Tropical, Facultade de Medicina do Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brasil). *Biología molecular y prevención en enfermedades tropicales.*

LIC. MARCELO DAELLI (Vicepresidente de Asuntos Tecnológicos del CONICET). *Biología molecular y terapeútica.*

**SIMPOSIO DEL COMITE DE ETICA:**

TITULO: *Aspectos éticos de la terapia génica.*

COORDINADOR: DRA. ELBA GIORGIUTTI (Médica genetista. Ex Presidente de la Sociedad Argentina de Genética. Directora del Instituto de Genética y Medicina Prenatal de Buenos Aires. Docente del Instituto de Etica Biomédica de la Universidad Católica Argentina.)

PANELES:

DR. OSVALDO PODHAJCER (Investigador de la Fundación Campomar). *Aspectos Eticos del uso de vectores virales.*

DR. ADOLFO IRIBARREN (Investigador del INGEBI. Docente de la Universidad de Quilmes). *Aspectos éticos de la terapia génica con oligonucleótidos.*

DR. MARTIN ROUBICEK (Médico genetista. Ex presidente de la Sociedad Argentina de Genética. Profesor Titular de Genética, Univ. Nac. de Mar del Plata). *Terapia génica y terapeútica convencional: ¿Existen diferencias?*

DR. PEDRO HOOFT (Juez en lo Penal de Mar del Plata. Presidente de la Asociación Argentina de Bioética. Profesor Titular de Filosofía del Derecho, Univ. Nac. de Mar del Plata). *Bioética de la terapia génica.*

**PREMIOS**

“ PREMIO SAIC ”, al mejor Proyecto de Investigación Biomédica presentado por médicos residentes de hospitales nacionales, provinciales, universitarios y privados.

“ PREMIOS FUNDACION LUCIO CHERNY ”, correspondientes a los dos mejores trabajos de investigación presentados en la **Mesa Interdisciplinaria**, por investigadores jóvenes (edad no superior a los 45 años) y por becarios.

“ PREMIO DR. PATRICIO COSSIO ”, al mejor trabajo de investigación correspondiente al área de Cardiología.

**MAESTRIA EN INVESTIGACION CLINICA**  
**FACULTAD DE MEDICINA - UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES Y**  
**SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGACION CLINICA**

(Presentada el 8 de octubre en la Facultad de Medicina de la UBA, N° de Expediente 15976)

El presente proyecto se refiere a la creación de una Maestría en Investigación Clínica que persigue como fin el elevar el nivel de aquellos graduados universitarios en el área de la salud, a través del aumento del conocimiento y las habilidades en algún dado tema de investigación biomédica. Asimismo se trata de uno de los estudios de postgrado más calificados y se continua, frecuentemente, en una Tesis de Doctorado.

La Universidad de Buenos Aires (UBA) prevee el desarrollo de maestrías en su Reglamento expte N° 33.711/85. Asimismo, la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), posee una experiencia de más de 30 años en la estimulación, enseñanza y convocatoria de investigadores jóvenes y en la discusión y presentación de trabajos científicos. Se puede decir con orgullo que sus miembros son investigadores científicos en ciencias de la salud y en toda la acepción del término; muchos de ellos son Profesores de la Facultad de Medicina o de otras Facultades de la UBA.

**OBJETIVOS DE LA MAESTRIA**

El objetivo de la maestría es la promoción del acceso a la investigación clínica de médicos y de otros profesionales del área de la salud, que hayan completado su formación básica en el campo respectivo (por ejemplo, residencia completa o formación básica en investigación).

**CARACTERISTICAS PEDAGOGICAS**

La maestría se desarrollará en forma teórico-práctica, con una duración total de 26 meses. Los aspectos teóricos se integrarán en asignaturas y la práctica se llevará a cabo en los laboratorios de los miembros de la SAIC que acepten la tarea y tengan facilidades para aceptar un educando al menos durante un año, incorporándolo a su plan de trabajo.

Las asignaturas propuestas incluirán contenidos de formación biológica general, de las líneas actuales de investigación médica y de conceptos generales

vinculados al desarrollo de cualquier investigación, así como también aspectos metodológicos y éticos atinentes a la problemática de la investigación. Esta propuesta se cumplirá en los primeros 12 meses de la maestría.

Los aspectos prácticos incluirán, como trabajo personal, la elaboración de la hipótesis, el aprendizaje de técnicas o metodologías necesarias y posibles dentro de los plazos de tiempo estipulados y la discusión y presentación de los resultados alcanzados en la forma de una TESINA. Esta segunda etapa de la maestría se cumplimentará en los 14 meses siguientes, correspondientes al segundo año y se realizará, en los distintos laboratorios y bajo la dirección de los investigadores propuestos, a elección del candidato.

## ORGANIZACION

### PLAN DE ESTUDIO

Se desarrollará durante los primeros 12 meses, a razón de 2 clases semanales de 3 horas de duración cada una. Se dictará en el ámbito de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires y, cuando exija el desarrollo de parte práctica, la misma se realizará en los laboratorios de la SAIC especificados más adelante, en los que se cuenta con el instrumental y equipamiento necesarios. Este plan de estudios tendrá **CARÁCTER OBLIGATORIO** y es el que se presenta a continuación.

#### **Módulo 1. Fundamentos de la Investigación Científica**

- 1.1 - Epistemología.
- 1.2 - Bioestadística y metodología de la investigación.
- 1.3 - Diseño experimental.

#### **Módulo 2. Biología Celular**

- 2.1 - Transporte de membranas y canales iónicos.
- 2.2 - Receptores.
- 2.3 - Mecanismos de transducción de señales.
- 2.4 - Radicales libres en biología y medicina.
- 2.5 - Proteínas de la matriz extracelular y moléculas de adhesión.

#### **Módulo 3. Genética y Biología Molecular**

- 3.1 - Conceptos de Biología molecular.
- 3.2 - Conceptos de Genética molecular.
- 3.3 - Bases moleculares de las enfermedades.
- 3.4 - Aspectos moleculares de la terapeútica.

**Módulo 4. Inmunofarmacología**

- 4.1 - Regulación de la respuesta inmunológica.
- 4.2 - Control neuroendocrino de la respuesta inmune.
- 4.3 - Mecanismos inmunofarmacológicos involucrados en distintos procesos patológicos.

**Módulo 5. Funciones integradas neurovegetativas y neuroendocrinas**

- 5.1 - Homeostasis y principios generales de los sistemas fisiológicos de control. Evaluación fisiológica y clínica del Sistema Nervioso Autónomo.
- 5.2 - Cronobiología.
- 5.3 - Neuroendocrinología.

**Módulo 6. Bases moleculares de la transformación celular**

- 6.1 - Epidemiología y patología del cáncer.
- 6.2 - Etiología del cáncer.
- 6.3 - Biología celular y molecular del cáncer.
- 6.4 - Relación huésped-tumor.
- 6.5 - Aportes de la biología al diagnóstico y tratamiento del cáncer.

**TESINA**

En los 12 meses restantes los educandos deberán concurrir a los distintos laboratorios de la Sociedad de Investigación Clínica propuestos, de acuerdo a los temas elegidos por ellos, en los que desarrollará su trabajo científico que culminará con la elaboración de una TESINA, dirigida por el investigador a cargo.

ARTÍCULO ESPECIAL

## SOBREVIDA PROLONGADA LIBRE DE SINTOMAS EN LA INFECCION POR VIH. CONVIVIR CON EL ENEMIGO.

MARÍA MARTA DE ELIZALDE DE BRACCO

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

*Es mucho mas difícil poder explicar lo que sentí cuando la Dra Borda me invitó a hacerme cargo de la tradicional Conferencia Lanari en la Reunión Anual de SAIC que dictar la conferencia en sí. Más allá de mi vínculo afectivo y de parentesco, el Dr Lanari -Pipo- fue una figura rectora, modelo, en mi vida. Mis recuerdos son mezcla agridulce de nostalgia, emoción, cariño y por encima de todo admiración. Fue un maestro, no sólo por sus enseñanzas específicas en cuanto a contenido, método y disciplina de trabajo, sino por su ejemplo. Enseñó con el vigor de su presencia, actitud y coherencia a todo nivel y por lo menos en mi caso, cada enseñanza estuvo mechada de ternura y de humor. Sólo deseo que se cumpla en mí y en todos sus discípulos esa aspiración suya de transmitir a los demás, más que una pila grande o pequeña de datos experimentales, una actitud que signifique una puerta abierta al crecimiento humano.*

**Resumen** La infección por VIH provoca una profunda depresión en el sistema inmune que lleva finalmente al desarrollo del SIDA en la mayoría de los individuos infectados. Sin embargo, un pequeño grupo permanece asintomático, con recuentos elevados y estables de CD4 y carga viral baja a lo largo de mas de 10 años de infección, aún en ausencia de tratamiento anti retroviral (sobrevivientes a largo plazo, LTS-LTNP). Tanto factores propios de la cepa viral infectante como de la respuesta del individuo infectado, pueden estar involucrados en esta manera particular de responder al desafío de VIH. Es importante estudiar que mecanismos están en juego en la resistencia natural de estos individuos a la infección y en su resistencia a la progresión de la misma para poder estimularlos o imitarlos en los demás pacientes VIH+.

Al comienzo de la epidemia de SIDA, se pensaba que la infección por el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH) provocaba la inexorable destrucción del sistema inmune, lo cual finalmente llevaba al desarrollo del SIDA y la muerte. La mayor parte de los estudios se concentraba en el análisis de los mecanismos inmunopatogénicos involucrados en el deterioro del sistema inmune y los esfuerzos para modificar el curso de la enfermedad se basaban en tratar de impedir la replicación viral y mejorar el manejo terapéutico de las infecciones oportunistas o enfermedades asociadas al SIDA. Gracias a esto se logró incrementar la expectativa de sobrevida de los pacientes infectados en general. Dentro del conjunto de los pacientes VIH+ muchos superan los 10 años de sobrevida, y de éstos sobrevivientes, hay algunos (5-10 %) que han permanecido asintomáticos luego de muchos años de infección por VIH. El estudio de estos individuos es crucial para poder comprender cuales son los factores que pueden estar asociados a una retardo en la progresión de la enfermedad causada por VIH, pues estos son los que deseáramos potenciar o estimular para poder mejorar el sistema

inmune de todos los pacientes infectados con VIH.

Una pregunta que aún queda sin responder es si estos individuos "no progresores" son un grupo particular de pacientes VIH+ que nunca llegarán al deterioro final del sistema inmune o si se trata de un grupo heterogéneo en el cual el perfil de progresión lenta responde a diferentes causas que sólo podrán ser dilucidadas luego de muchos años de análisis de la evolución de la enfermedad.

Distintos criterios han sido utilizados para incluir a los pacientes VIH+ dentro del grupo de sobrevivientes o no progresores a largo plazo (long term survivors, LTS; long term non progressors, LTNP). Dentro del grupo de adultos LTS-LTNP se diferencian dos grupos basados en aspectos clínicos y en la estabilidad del recuento de linfocitos CD4 (1): 1) individuos asintomáticos con niveles altos y estables de CD4 y 2) individuos clínicamente estables con bajos recuentos de CD4 y sin condiciones definitorias para SIDA (Tabla 1). A esta definición podría actualmente agregarse la valoración directa de la carga viral, establecida por el número de copias de RNA viral detectado en plasma, sangre o ganglios linfáticos, la cual es

Tabla 1: Definición de individuos adultos VIH+ sobrevivientes a largo término (LTS-LTNP).

**LTS-LTNP ASINTOMÁTICOS, CON RECUENTOS ALTOS Y ESTABLES DE LINFOCITOS CD4+:****Categoría de CDC (1993): A1**

- \* Recuentos de CD4+ determinados repetidas veces a lo largo de > 8 años
- \* Pendiente de CD4+ con pérdida de < 5 células x 10<sup>6</sup>/l por año; la primera determinación de la pendiente realizada después de 1 año de infección.
- \* Recuento de CD4 > 500 células x 10<sup>6</sup>/l.
- \* Sin tratamiento antiviral.

**LTS-LTNP CLÍNICAMENTE ESTABLES, CON BAJO RECUENTO DE CD4+.****Categorías de CDC (1993): A3, B3.**

- \* Recuento de CD4+ < 200 células x 10<sup>6</sup>/l por más de 5 años.
- \* Sin diagnóstico de condiciones definitorias para SIDA.

habitualmente baja en los individuos LTS-LTNP (2).

Los factores que determinan esta evolución benigna de la infección por HIV+ pueden estar relacionados al virus infectante y/o a la respuesta inmune del individuo infectado.

**Características del virus asociadas a progresión de la enfermedad.**

Utilizando técnicas sensibles como la PCR, es posible detectar VIH-RNA prácticamente en todos los individuos infectados con VIH, aunque haya sido imposible aislar virus infectivo o antígeno p24 a partir de plasma o células de ese individuo (3). La carga viral tiende a ser menor en LTS-LTNP que en los pacientes rápidamente progresores (2). En cuanto a la recuperación de virus infectante por cultivo, hay menor probabilidad de lograr aislamientos a partir de material obtenido de LTS-LTNP que de pacientes progresores (2). En este caso, es necesario tener en cuenta el tipo de técnica utilizada para el aislamiento. En algunos ensayos, como las células "blanco" de la infección son líneas celulares de estirpe linfocitaria, los aislados primarios con tropismo hacia células de la serie monocito/macrófágica (M/M) pueden ser pobemente infectantes. En cambio, utilizando metodología que privilegie las interacciones celulares espontáneas y permita revelar la infección de M/M, es posible recuperar VIH a partir de material de pacientes LTS-LTNP con baja o nula carga viral (4). En la Figura 1 se muestra un ejemplo de aislamiento de VIH logrado por cultivo prolongado que favorece la multiplicación de virus macrófago-trópicos (5). La replicación de VIH en este paciente LTS-LTNP, con baja carga viral plasmática (<300 copias/ml) y con más de 10 años de sobrevida libre de enfermedad en ausencia de tratamiento, se produjo a los 15-20 días de cultivo, luego de la activación de M/M por ingestión de células apoptóticas. Las células infectadas, demostradas por tinción con anticuerpo anti-p24, eran

de estirpe M/M.

Algunos estudios sobre fenotipo de VIH y su relación con la progresión de la enfermedad indican que las cepas que no inducen sincios celulares (NSI) son mas frecuentemente halladas en los pacientes LTS-LTNP (1), lo que no excluye la presencia de cepas NSI en los individuos progresores. La aparición de cepas inductoras de sincios celulares (SI) ha sido correlacionada con un aumento de la carga viral, mayor efecto citopático e infectividad y por ende con mayor riesgo de progresión clínica (1, 4). Sin embargo no es posible establecer si la mayor frecuencia de cepas SI en los individuos progresores es consecuencia de la falla primaria de alguno de los mecanismos inmunes de control en esos individuos, que permite el desarrollo de VIH-SI. También se buscó establecer una correlación entre la evolución clínica de pacientes infectados con VIH y delecciones en el genoma viral. En este sentido hubo una observación muy interesante realizada en receptores de una transfusión de sangre de un donante cuyo VIH tenía delecciones en el gen nef en la región de LTR. Ni el donante ni los receptores de la transfusión contaminada mostraron signos de progresión de la enfermedad 12 años después del contagio (6).

**Características de los individuos infectados con VIH involucradas en la sobrevida prolongada a la infección.****a) Co-receptores**

Hace mas de 10 años se demostró que la molécula CD4 ubicada en la membrana de linfocitos y macrófagos era el receptor primario para el VIH (7). La gp120 de la envoltura viral se unía directamente a CD4 expresado en linfocitos, macrófagos y células transfectadas con CD4, pero se reconoció que la sola unión de CD4 con VIH no aseguraba la infección de las células CD4+. Durante 10 años se buscó afa-

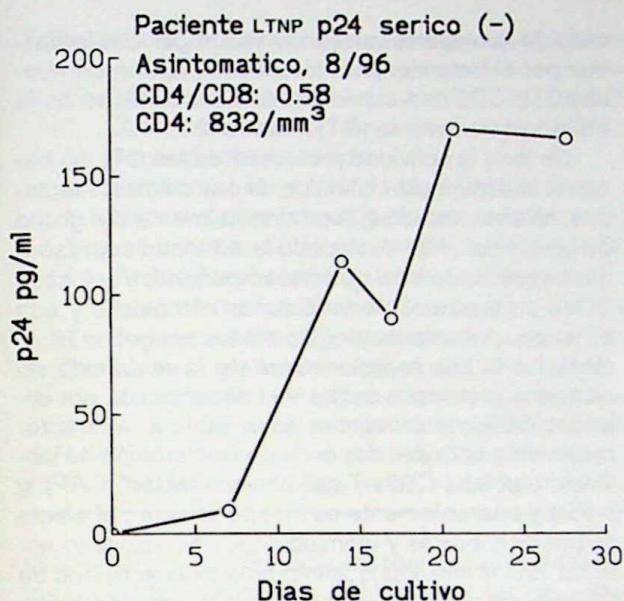


Figura 1.- Producción de p24 en cultivo prolongado de leucocitos mononucleares periféricos en un paciente LTS-LTNP. Las células mononucleares periféricas aisladas por centrifugación en gradiente de Ficoll-Hyphaque se colocaron en cultivo en ausencia de estímulo (Ruibal-Ares et al., referencia 5) y secosechó sobre todo a distintos tiempos valorando la replicación viral midiendo la proteína del core p24 con un ensayo de ELISA comercial.

nosamente identificar moléculas que actuaran como co-receptores de VIH. Así fue que en 1996, se demostró la existencia de un co-receptor para cepas de VIH aisladas de líneas de linfocitos transformados (VIH linfo-trópico). Resultó ser una molécula perteneciente a la familia de receptores con 7 dominios transmembrana asociados a las proteínas G reguladoras (7DT) llamada inicialmente fusina (7). Al reconocer que dentro de la familia de receptores 7DT, la fusina pertenecía al grupo de receptores para  $\alpha$ -quimioquinas, se cambió su nombre por el de CXCR-4. La quimioquina SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) actúa como ligando de CXCR-4 y bloquea el ingreso de VIH linfo-trópico a los linfocitos T transformados (8). De la misma manera que para CXCR-4, en forma casi simultánea se demostró que las cepas macrófago-trópicas utilizaban otro co-receptor miembro de la familia 7DT: el receptor para las  $\beta$ -quimioquinas CCR-5 (9, 10) cuyos ligandos fisiológicos (RANTES, MIP1- $\alpha$  y MIP1- $\beta$ ) también interferían la fusión de VIH en macrófagos y en células T de cultivos primarios (9). Posteriormente se identificaron otras moléculas pertenecientes a la familia de receptores de quimioquinas que pueden actuar como co-receptores para el VIH: los receptores para  $\beta$ -quimioquinas CCR-2b y CCR-3 (11) y más recientemente la molécula STRL33 que puede actuar como co-receptor de

VIH tanto de cepas linfo-trópicas como macrófago-trópicas con igual eficacia (12).

Inmediatamente se buscó explicar si la resistencia de los LTS-LTNP a los efectos de la infección por VIH estaba relacionada a mutaciones en las moléculas co-receptoras. Combinando los hallazgos de laboratorio sobre co-receptores para VIH macrófago-trópicos con observaciones clínicas acerca de personas repetidamente expuestas a la infección, que habían permanecido seronegativas, se demostró que una mutación en CCR-5 podría aportar protección frente a VIH (13). Así se demostró que en casi todos los individuos homocigotas para una delección de 32 pares de bases del gen que codifica para CCR-5, repetidamente expuestos a VIH, la infección por VIH no prospera (14, 15). La presencia del gen defectuoso otorga protección contra la infección y confiere ventajas en la resistencia a VIH y al desarrollo de la enfermedad, pues aún en individuos heterocigotos para la delección, la progresión de la enfermedad es más lenta (14). Pese a la importancia de CCR-5 para el logro de una infección exitosa, especialmente por vía sexual, CCR-5 no es el único co-receptor. Dependiendo de la cepa de virus empleada, es posible infectar células homocigotas para el gen CCR-5 defectuoso ( $\Delta$ -32 CCR-5) (16). En este caso, los co-receptores utilizados podrían ser CCR-2, CCR-3 o STRL33. Este último es interesante pues se expresa en linfocitos T activados y podría contribuir a la diseminación de las cepas de VIH linfo-trópicas. En general, la expresión de CCR-5 y CXCR-4 en linfocitos T es reciproca: los linfocitos T en reposo tienen máxima expresión de CXCR-4 mientras que los activados expresan más CCR-5 (17). A esta altura de los conocimientos sobre co-receptores queda claro que la presencia de la mutante  $\Delta$ -32 CCR-5 no garantiza resistencia a la infección por HIV ni es la explicación universal para el fenómeno de resistencia a la progresión de la enfermedad asociada a la infección por VIH.

#### b) Inmunidad humoral

Los estudios serológicos sugieren que los títulos elevados de anticuerpos contra proteínas del core viral (p24, p17) se asocian con supervivencia prolongada a la infección por VIH. Esto es evidente al comparar LTS-LTNP con individuos VIH+ cuya curva de depleción de linfocitos CD4 es acelerada (1), pero un título elevado de anti-p24 no garantiza que la pérdida de CD4 no va a ocurrir. Con respecto a anticuerpos anti-VIH de otras especificidades, los LTS-LTNP tienen en general títulos mayores contra productos de los genes gag (p55), pol (p31/66) y env (gp41 y sectores NH2- terminales y CCOH-terminales de gp120) que los progresores. Dentro de los anticuerpos con especificidad para productos del gen env,

los títulos de anticuerpos contra el dominio V3 (implicado en la neutralización viral) no fueron significativamente diferentes entre individuos progresores y no progresores (1), pero no se sabe si estos resultados obtenidos con ensayos de neutralización de cepas adaptadas al cultivo son representativos de lo que sucede in vivo o con aislados primarios.

Con ensayos de citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC) utilizando como "blanco" células infectadas que expresaban antígenos de envoltura de VIH, se demostró que los pacientes que progresaban más lentamente tenían títulos mayores de anticuerpos que los rápidamente progresores (18).

En conjunto estos resultados sugieren que los individuos LTS-LTNP tienen mejor respuesta humoral contra VIH que los progresores, pero no se sabe si esta respuesta humoral es la causa o la consecuencia de la menor progresión.

### c) Inmunidad celular

Una característica de los individuos LTS-LTNP es tener un alto recuento de linfocitos T CD8+. Como el número de linfocitos T CD4+ es menor que el de los controles seronegativos en esos mismos pacientes, la relación CD4/CD8 es baja. Esta relación es más baja en los LTS-LTNP que en los pacientes VIH+ progresores, pues en estos el recuento de linfocitos CD8+ es menor que en LTS-LNTP. En base a estas observaciones y al conocimiento general acerca del papel que desempeñan los linfocitos citotóxicos CD8+ (CTL-CD8) en el control de la diseminación de los virus se puso particular énfasis en determinar su papel en la progresión de la infección por VIH. La respuesta citotóxica CTL-CD8, restringida por antígenos de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA-clase I) es vigorosa en las etapas iniciales de la infección y coincide temporalmente con el descenso de la viremia. En individuos resistentes a la infección por VIH pese a repetidas exposiciones (19) y en los niños infectados perinatalmente que tienen evolución más benigna (20), se pueden demostrar CTL-CD8 específicas para VIH aún en presencia de bajas cargas virales. Es una respuesta policlonal, con CTL que reconocen distintos antígenos virales presentados dentro del contexto de varios antígenos HLA-clase I (21). La presión ocasionada sobre el virus por la respuesta CTL podría inducir mayor variabilidad antigenica llevando a fenómenos de escape pero esto es poco frecuente en los LTS-LTNP con eficiente y amplio repertorio de CTL. En estos individuos pese a la gran variabilidad de las cepas aisladas, la eficiencia de las CTL contribuye a mantener bajo control la diseminación viral. Mas aún, no se requiere variación antigenica para generar la respuestas citotóxicas CTL contra diferentes epitopes dominantes del VIH. En el

caso de que aparezcan variables antigenicas inducidas por el tratamiento anti-retroviral, aparecen nuevas CTL-CD8 con especificidad para epitopes en la transcriptasa reversa (RT) mutada (21).

No toda la actividad protectora de las CTL se basa en la eliminación citolítica de las células infectadas. Muchos estudios, fundamentalmente del grupo de Levy y col., han destacado la actividad supresora de la replicación viral que desempeñan los linfocitos CD8+ en ausencia de fenómenos citotóxicos y aún de reconocimiento restringido por los antígenos HLA-clase I o II. Las características de la respuesta no citotóxica protectora contra VIH desarrollada por linfocitos CD8+ se presentan en la Tabla 2. Aparentemente esta actividad depende de la liberación de factores solubles ("CD8+ T cell antiviral factor", CAF) al medio y aparentemente es independiente del efecto de otras citoquinas y quimoquinas con actividad antiviral. En los individuos asintomáticos la actividad de CAF es mayor que en los pacientes rápidamente progresores (22). En conjunto, estas observaciones sugieren que la prevalencia de una vigorosa respuesta CTL-CD8 anti-VIH de amplio espectro y los elevados números de linfocitos T CD8 funcionalmente activos capaces de liberar factores supresores del VIH son características de los individuos VIH+ con supervivencia prolongada y serían prototipo de respuestas a promover en los demás pacientes infectados para mejorar su performance.

### d) Citoquinas

Como la progresión de la infección con VIH trae aparejada una pérdida de la respuesta inmunitaria mediada por células (CMI), la CMI se asocia a citoquinas del tipo Th1 (IL-2, IFN<sub>γ</sub>, IL-12) y la inmunidad humoral a citoquinas de tipo Th2 (IL-4, IL-10, IL-5), se buscó establecer una relación entre el perfil de citoquinas detectado y la evolución de la infección. En los inicios de la década del 90, la teoría del viraje del perfil de citoquinas de Th1 a Th2 ("switch Th1-Th2") como característica de la progresión a SIDA era ampliamente aceptada (23). En la actualidad, si bien se admite la predominancia del perfil Th2 en las etapas sintomáticas y en el SIDA, no se acepta de manera absoluta el dogma del "switch Th1-Th2" como causa fundamental del deterioro progresivo del sistema inmune. En los individuos con carga viral baja, asintomáticos y con recuentos altos de CD4 los valores de citoquinas Th1 eran mayores que los de citoquinas Th2 en ensayos realizados con células mononucleares periféricas totales (24). Pero es necesario tener en cuenta que la producción de citoquinas Th1-Th2 no depende sólo de su síntesis por subsets de linfocitos T CD4+, sino que otros linfocitos (CD8+, NK) también pueden contribuir al balance final de ci-

Tabla 2: Características de la respuesta no-citotóxica anti-HIV de las células CD8+.

- Sólo observada con linfocitos T CD8+ (no CD4+, B, NK o macrófagos).
- Observada también tanto con linfocitos CD8+ de los ganglios linfáticos como de sangre periférica.
- Dependiente de la dosis.
- No provoca la muerte de la célula infectada.
- No restringida por antígenos de histocompatibilidad.
- Las células activas son fundamentalmente CD8+ HLA-DR+, CD8+ CD28+.
- Bloquea replicación en células CD4+ natural o agudamente infectadas.
- Suprime replicación de VIH a bajas relaciones de CD8+/CD4+.
- Correlacionada con el estado clínico y el número de CD4+ en sangre.
- Inhibe la replicación a nivel de transcripción.
- Mediada -por lo menos en parte- por factores solubles.
- No interfiere con la activación o proliferación de 4+.
- Activa contra cepas de citopáticas y no citopáticas.
- Observada en CD8+ de primates no humanos infectados con VIH o VIS.

toquinas Th1-Th2. En estudios realizados con linfocitos CD8+ de pacientes LTS-LTNP, estas células mantienen su capacidad de producir IL-2, IFN<sub>γ</sub> y -en menor medida- IL-10 (perfil Th0) al igual que las CD8+ de pacientes seronegativos. En cambio en los progresores, las células CD8 son incapaces de producir IL-2 e IL-10 (25). Las características favorables se dan especialmente en linfocitos CD8 que además expresan el antígeno CD28 involucrado en la activación de la síntesis de IL-2, y la molécula CD95 (Fas) asociada a la muerte celular programada (25).

Como algunas quimioquinas actúan *in vitro* inhibiendo la fusión de VIH luego de su unión a la molécula CD4 (9), en pacientes LTS-LTNP se buscó correlacionar el nivel de β- y α- quimioquinas en linfocitos totales o deplecionados de CD8 con la posibilidad de aislar VIH en esos individuos. Los resultados no fueron definitorios en este pequeño número pacientes (26).

#### e) Genética

La susceptibilidad genética a VIH podría operar teóricamente a tres niveles: 1) susceptibilidad a la infección en el encuentro inicial; 2) progresión de la infección una vez establecida; 3) susceptibilidad ge-

nética a las condiciones que definen el SIDA una vez que la depleción de los linfocitos CD4 ya se ha producido. Hasta el momento las asociaciones entre progresión de la enfermedad y el sistema mayor de histocompatibilidad no son concluyentes (27). En particular, llama la atención que los chimpancés, con gran homología en su sistema mayor de histocompatibilidad con respecto a *Homo sapiens* sean resistentes a la enfermedad causada por la infección con VIH. Sin embargo hay combinaciones de haplotipos descritas en el hombre que se asocian con mayor frecuencia a progresión o no progresión de la enfermedad por VIH. Estas se resumen en la Tabla 3.

#### f) Activación generalizada del sistema inmune y apoptosis

La activación de las células que componen el sistema inmune puede llevar a su diferenciación, o en ausencia de señales de sobrevida (28) a la muerte celular programada por apoptosis (29). La apoptosis linfocitaria puede ser un elemento importante en el desarrollo de la inmunodeficiencia que lleva al SIDA luego de la infección por VIH. Si bien la propuesta original de Ameisen y Capron, quienes vinculaban directamente al fenómeno de apoptosis con la deple-

Tabla 3: Asociación de antígenos HLA con progresión de la enfermedad causada por VIH

#### Progresores rápidos

A1, A9, A11, A23, A24, A28+TAP2.3, A29+TAP2.1, B8+DR3, B35+Cw4, DR2, DR5.

#### LTS-LTNP

A9, A25,+TAP2.3, A26, A32, B5, B14, B18, B27, B51,B57, Bw4, DR5, DR6, DR7, DRB1\*0702+DQA1\*0201, DR13.

#### Individuos seronegativos frecuentemente expuestos a VIH

A2, A28, DR13

Datos tomados de Westby, Manca y Dagleish, Immunol Today 1996;17: 120-126.

ción de linfocitos CD4 en el SIDA (30), no fue validada por otros trabajos de investigación, los resultados de estudios en pacientes asintomáticos, LTS-LTNP o progresores sugieren que en pacientes en las fases sintomáticas o terminales de la infección por VIH (31) la acumulación de células apoptóticas tanto CD4+ como CD8+ es mayor que en pacientes asintomáticos o LTS-LTNP. Es probable que, en pacientes LTS-LTNP y VIH+ asintomáticos, como la carga viral de VIH, la frecuencia de infección con cepas de VIH citopáticas (SI) y la frecuencia de infecciones oportunistas concomitantes son menores, el nivel general de activación del sistema inmune sea más bajo que en los pacientes VIH+ progresores, lo cual a su vez determina un índice apoptótico menor. La pérdida progresiva de clones de células T puede llevar a una reducción en la variedad del repertorio T, de la misma manera que sucede luego de la activación masiva por superantígenos bacterianos. No hay estudios que determinen si la riqueza del repertorio T en individuos LTS-LTNP es comparable a la de los controles normales. Por el contrario, se han comunicado distintas perturbaciones en el repertorio T de pacientes progresores que llevaron a la hipótesis de la existencia de un superantígeno asociado a VIH (27).

### Conclusión

Del estudio de los pacientes VIH+ no progresores se pueden sacar varias enseñanzas útiles para tratar de imitar en el resto de los individuos infectados la respuesta de los LTS-LTNP al desafío de la infección por VIH. En primer lugar resulta claro que los LTS-LTNP aprovechan distintos mecanismos para convivir saludablemente con el enemigo y que hay varias maneras de llegar a un equilibrio con este patógeno letal. Obviamente uno no puede cambiar el azar del encuentro con una cepa más o menos virulenta, con o sin delecciones del gen nef, ni la constitución genética de quien ha sido infectado ( $\Delta$  32-CCR-5, haplotipo HLA). El balance entre la carga viral y la capacidad de manejo del sistema inmune es algo que puede ser atacado, por ejemplo con combinaciones anti-retrovirales que reduzcan la multiplicación en células permisivas. Pero en este caso cabe destacar que se debe considerar el conjunto de las células capaces de albergar y replicar el VIH, no sólo los linfocitos T CD4+. También es recomendable evitar la activación incontrolada del sistema inmune para no agotarlo y desencadenar la muerte celular programada de los linfocitos que llevará a la inmuno deficiencia y al empobrecimiento del repertorio T. En la actualidad los mecanismos inmunes favoritos para la potenciación y estímulo en los pacientes infectados parecen ser los relacionados a la actividad de

CTL-CD8 y la actividad supresora no lítica de los linfocitos CD8+. Pese a esto, no es posible descartar que la respuesta citotóxica CTL-CD8 en algunos casos contribuya a la patogenia autoinmune de esta enfermedad (32). También es atrayente desarrollar sistemas de interferencia que imiten la situación natural presente en los individuos homocigotas para la delección  $\Delta$ -32 CCR-5, o sea diseñar tratamientos con análogos de las quimioquinas que bloquee la fusión de VIH a sus co-receptores.

A pesar de todo, sigue vigente aún ahora en la era de la terapia combinada y de innovadores tratamientos reconstitutivos, la noción de que la mejor estrategia para evitar la acción de VIH es impedir su ingreso al organismo con métodos preventivos, es decir: evitar tener que convivir con el enemigo.

### Summary

HIV infection leads to the severe impairment of the immune system that characterizes AIDS in most infected individuals. However, a small group of infected individuals remains asymptomatic, with low viral burden and stable undecreasing CD4 counts after the first year of infection in the absence of anti retroviral treatment (long term survivors -long term non progressors, LTS-LTNP). Both viral and host factors may determine this benign evolution of an otherwise fatal disease. In order to stimulate the host responses that may favour resistance against HIV infection or determine slow progression, it is important to study the mechanisms involved in LTS-LTNP.

### BIBLIOGRAFIA

- Schrager LK, Young JM, Fowler MB, et al. Long-term survivors of HIV-1 infection: definitions and research challenges. AIDS 1994; 8(Suppl); S95-S108.
- Garbuglia AR, Salvi R, Di Caro A, et al. In vitro activation of HIV RNA expression in peripheral blood lymphocytes as a marker to predict the stability of non-progressive status in long-term survivors. AIDS 1996; 10; 17-21.
- Connor RI, Mohri H, Cao Y, Ho DD. Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4+ T-lymphocyte decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. J Virol 1993; 67; 1722-77.
- Ruibal-Ares B, Mendez G, Perez Blanco R, Tezanos Pinto M, de Bracco MME. HIV replication in cultured peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from HIV-infected patients. Enviado a publicar, 1997.
- Ruibal-Ares B, Riera NE, de Bracco MME. Macrophages, multinucleated giant cells and apoptosis in HIV+ patients and normal donors. Clin Immunol Immunopathol 1997; 82;102-116.
- Deacon NJ et al. Genomic structure of an attenu-

- ated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* 1995; 270; 988-991.
7. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G-protein coupled receptor. *Science* 1996; 272; 872-877.
  8. Bleul CC et al. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996; 382; 833-835.
  9. Deng H et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996; 381; 661-667.
  10. Dragic T et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CD-CKR-5. *Nature* 1996; 381; 667-673.
  11. Hyeryun C et al. The  $\beta$ -chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 1996; 85; 1135-1148.
  12. Liao et al. STRL33, a novel chemokine receptor-like protein, functions as a fusion cofactor for both macrophage-tropic and T cell line-tropic HIV-1. *J Exp Med* 1997; 185; 2015-2023.
  13. Liu R et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996; 86; 367-377.
  14. Samson M et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996; 382; 722-725.
  15. Dean M et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CCR5 structural gene. *Science* 1996; 273; 1856-1862.
  16. Balotta C, Bagnarelli P, Violin M et al. Homozygous  $\Delta$ 32 deletion of the CCR-5 chemokine receptor gene in an HIV-1 infected patient. *AIDS* 1997; 11; F67-F71.
  17. Vyakarnan A. Progress on IL-16 as a potent CD8-derived anti HIV factor; back to the Th1-Th2 paradigm in AIDS; and HIV coreceptor complexity. *AIDS Targeted information* 1997; 11; R96-R97.
  18. Baum LL et al. HIV-1 gp120-specific antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity correlates with rate of disease progression. *J Immunol* 1996; 157; 2168-2173.
  19. Harrer et al. Cytotoxic T lymphocytes in asymptomatic long term non progressing HIV-1 infection. *J Immunol* 1996; 156; 2616-2623.
  20. Wasik TJ et al. Diminished HIV-1 specific CTL activity is associated with lower type 1 and enhanced type 2 responses to HIV-1 specific peptides during perinatal HIV infection. *J Immunol* 1997; 158; 6029-6036.
  21. Haas G et al. Dynamics of HIV variants and specific cytotoxic T-cell recognition in non progressors and progressors. *Immunol Lett* 1997; 57; 63-68.
  22. Levy JA, Mackewicz CE, Barker E. Controlling HIV pathogenesis: the role of non cytotoxic anti-HIV response of CD8+ cells. *Immunol Today* 1996; 17; 217-223.
  23. Clerici M, Shearer G. A TH1 - TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today* 1993; 14; 107.
  24. Clerici M et al. Human immunodeficiency virus (HIV) phenotype and interleukin-2/interleukin 10 ratio are associated markers of protection and progression in HIV infection. *Blood* 1996; 88; 574-579.
  25. Zanussi S et al. CD8+ lymphocyte phenotype and cytokine production in long term non-progressor and progressor patients with HIV infection. *Clin Exp Immunol* 1996; 105; 220-224.
  26. Vicenzi E et al. Hemophilia and non progressive human immunodeficiency virus type 1 infection. *Blood* 1997; 89; 191-200.
  27. Westby M, Manca F, Dagleish AG. The role of immune responses in determining the outcome of HIV infection. *Immunol Today* 1996; 17; 120-126.
  28. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* 1993; 14; 126.
  29. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Brit J Canc* 1972; 26; 239.
  30. Ameisen JC, Capron A. Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. *Immunol Today* 1991; 12; 102.
  31. Rubial-Ares B, Riera NE, de Bracco MME. Apoptosis. Su papel en la ontogenia del sistema inmune y en la infección por HIV. *Medicina (Buenos Aires)* 1994; 54; 661-670.
  32. Zinkernagel RM. Are HIV-specific CTL responses salutary or pathogenic? *Current Opinion in Immunol* 1995; 7; 462-470.

## INDICE ALFABETICO DE AUTORES

con número de Resumen

- Abel, MC 327  
 Abraham, N 138  
 Acevedo, S 241  
 Actis, A 235  
 Adris, S 225, 280  
 Agrasal, C 91  
 Aguado, L 27, 28, 35, 36  
 Agüero, A 330  
 Agüero, RM 50  
 Aguirre, J 52  
 Aguirre Ghiso, JA 236, 301, 302,  
     312, 321  
 Aires, VA 173  
 Albanese, A 293  
 Albanese, AM 102  
 Albanese, E 102, 293  
 Albanese, P 293  
 Albertal, J 262  
 Albornoz, L 201  
 Albornoz, LE 69  
 Alejo, D 124  
 Alippi, RM 336  
 Allegri, R 100, 109  
 Almada, L 43, 195  
 Almará, AM 42, 118, 183  
 Almirón, MA 115  
 Alonso, DF 227, 244  
 Alvarez Filgueira, ML 334  
 Alvarez, AL 275  
 Alvarez, B 250  
 Alvarez, C 128, 136  
 Alvarez, D 201  
 Alvarez, E 229, 346,  
 Alvarez, EO 106, 107  
 Alvarez, L 178  
 Alvarez, ML 50  
 Alvarez, P 178  
 Ambrosio, A 113, 114  
 Andreu, C 29  
 Anesini, C 149  
 Angerosa, M 58, 59, 61, 71, 73, 206,  
     222  
 Antúnez, MI 152  
 Apartin, K 15  
 Aquino, B 122  
 Arana, R 132, 133  
 Arce, A 89  
 Archuby, FM 79, 300  
 Arias, P 88, 90  
 Armando, I 24, 52, 70, 278,  
 Arranz, CT 251, 252, 266, 331  
 Arriaga, S 187  
 Arriaga, SM 42, 64  
 Arrieta, M 15  
 Arizurieta, EE 52, 53, 57  
 Arroyo, G 123, 124  
 Arrozagaray, G 3  
 Arzt, E 136, 281  
 Ashkar, E 338  
 Astudilla, CH 342, 352  
 Aubier, M 116  
 Auger, S 246, 271, 272  
 Avila, JL 119  
 Ayala, M 307  
 Ayelli Edgar, V 155  
 Ayuso, S 33  
 Bacman, SR 133, 290  
 Baistrocchi, R 220  
 Bal de Kier Joffe, E 236, 301, 302,  
     312, 318, 320, 321  
 Balañá, ME 228, 236  
 Balaszczuk, AM 251, 252, 266, 331  
 Balbis, A 333  
 Balschun, D 131  
 Bani, PC 123, 124  
 Barañao, JL 74, 104  
 Barañao, RI 161  
 Barceló, C 255  
 Baré, P 121, 148  
 Barontini, M 24, 52, 70, 278, 279  
 Barreiro, C 105  
 Barrio, M 307  
 Bartellini, MA 122  
 Basabe, JC 70, 341, 353  
 Batlle, AM del C 316  
 Batlle, YA 101, 217, 240, 292  
 Bearzotti, M 137, 139  
 Becú de Villalobos, D 85  
 Bedecarrás, P 33  
 Beinlich, A 357  
 Bekinschtein, P 145, 146  
 Belgorosky, A 86, 160, 165, 180  
 Belloso, W 122  
 Bellucci, S 266  
 Bengió, R 3  
 Bengochea, L 193  
 Benítez, H 342  
 Bercellini, MA 215  
 Berenstein, M 280  
 Berensztein, E 160, 165, 180  
 Berg, G 185  
 Bergoc, R 308  
 Berguer, P 146  
 Berra, A 133  
 Bertolesi, GE 232, 234  
 Bertotti, S. C. 358  
 Besedovsky, HO 131  
 Beviacqua, M 150  
 Bianchi, M 356  
 Bianciotti, L 253  
 Bilder, C 38  
 Binda, MM 304, 310  
 Blanco, A 5, 14, 18, 19, 20  
 Blanco, LA 162  
 Blaquier, JA 135  
 Bockstahler, LE 118  
 Bogado, C 60, 344  
 Bolondi, A 307  
 Bonaventure, G 105  
 Bonavita, CD 41  
 Bonetto, AJ 299  
 Bonfil, RD 304, 310, 317  
 Borda, ES 38, 132, 133, 143, 149,  
     205, 216, 218, 246, 248, 249,  
     269, 270, 273, 274  
 Borda, TG 98, 295  
 Bordenave, H 150  
 Borodinsky, LN 30  
 Bottasso, O 119  
 Bouzas, MB 125  
 Bover, L 303, 306, 307, 309  
 Boveris, A 46, 182  
 Bozzini, CE 255  
 Bracco, MME de 143, 144, 148, 274  
 Brandizzi, D 238  
 Brauer, I 289  
 Bravo, AI 225, 233, 280, 307, 309  
 Bregni, C 177  
 Bregonzo, C 82, 111  
 Brignone, CMC de 338  
 Brignone, JA 338  
 Brites, F 41  
 Brizio, MP 127  
 Bruera, O 298  
 Brusco, LI 299  
 Bruzzone, L 347, 348

- Buggiano, V 145, 146  
 Burdman, JA 30  
 Busch, L 216  
 Bussmann, LE 330  
 Busso, JM 203  
 Bustuoabad, OD 305, 319  
 Buzaleh, AM 217
- Caballero, F 240  
 Cabrera, R 82, 111  
 Calandra, RS 75, 170, 171, 233  
 Calcagno, L 354  
 Caldas Lopes, E 229  
 Callegari, E 212  
 Calvete, JJ 174  
 Calvo, JC 77, 350, 351  
 Calvo, L 354  
 Cameo, M 354  
 Campana, V 208, 260  
 Campo, S 33, 75, 170  
 Camusso, JJ 273  
 Cánepa, D 156, 167, 168  
 Cannata, MA 69  
 Canteros, G 87  
 Capani, F 251, 325  
 Capozza, RF 334, 336, 345, 346,  
     349  
 Capurro, MI 233, 306  
 Carballo, GA 1, 8, 14, 21  
 Carboné, S 93, 95, 353  
 Cardalda, C 101  
 Cardinali, DP 89, 91, 134, 299  
 Cardoni, RL 152  
 Cardoso, A 211  
 Cardoso, E 130  
 Carnavale, C 39, 48, 189, 191, 198  
 Caro, R 153, 154  
 Carou, MC 162, 179  
 Carranza, A 70  
 Carrasco, M 36  
 Carrascosa, R 173  
 Carrasquedo, F 54, 204, 224  
 Carregal, M 267  
 Carreras, MC 46, 100, 110, 116,  
     254,  
 Carrillo, MC 39, 48, 189, 191, 198  
 Carrizo, PH 210  
 Caruso, S 235  
 Casais, M 27  
 Casanova, MB 169  
 Casas, A 316  
 Casellas, A 6  
 Cassataro, J 94  
 Cassini, M 122  
 Castaño, EM 103
- Castello, P 177  
 Castiglioni, P 261  
 Castrillón, P 134  
 Castro Ríos, M 38  
 Castro, G 41  
 Castuma, MV 241, 276  
 Catania, V 51, 187  
 Catanzaro, C 352  
 Catanzaro, O 342  
 Cavanagh, EMV de 54, 204, 224  
 Cebral, E 87, 159  
 Ceccarelli, EA 183  
 Cerretini, R 3  
 Cerruti, S 267  
 Cerruti, J 213, 214  
 Cesolari, JA 184  
 Chamson-Reig, AS 32, 178, 355,  
     356  
 Charreau, EH 228, 236, 242, 311  
 Chemes, H 341  
 Chemes, L 29  
 Chernajovsky, Y 225, 280  
 Chertkoff, L 105  
 Chervin, A 130  
 Chiappe, MA 346  
 Chiodi, M 79  
 Chisari, AN 26  
 Cidre, LL de 232  
 Cigorraga, S 156, 166, 167, 168,  
     170  
 Cingolani, H 250  
 Ciocca, DR 317  
 Civallero, G 286  
 Cohen, DJ 157, 158, 172  
 Cointry, GR 334, 345, 346, 349  
 Coirini, H 97  
 Coleman, R 37, 186  
 Colman Lerner, A 104  
 Colombo, LL 243  
 Comini, E 130  
 Contreras, L 130  
 Contreras Ortiz, O. 358  
 Corchs, JL 332  
 Corigliano, A 268  
 Cornejo Maciel, F 84  
 Coronel, CE 157, 181  
 Correa, AH 56  
 Cortizo, AM 347, 348  
 Costa, LE 182  
 Costa, M 331  
 Costa, MA 251, 252  
 Costas, M 136  
 Cottiar, A 324  
 Coya Nuñez F. 358  
 Cremaschi, G 98, 153, 154, 155,  
     249, 270, 277, 295
- Cresta, MA 200, 353  
 Creus, S 170  
 Cricco, G 308  
 Crottogini, AJ 259  
 Cuasnícú, PS 157, 158, 172  
 Cuello, MT 237  
 Cupelli, F 190
- Da Cunha, V 9  
 Dagatti, MS 322  
 Dagrosa, MA 47  
 Dalamon, V 267  
 Damasco, MC 350  
 Daniele, S 64  
 Dardis, A 25, 160  
 Dascal, E 341  
 Davel, L 230, 232  
 Davio, C 154  
 De Bortoli, M 35  
 de Bronia, DH 117  
 de la Riva, IJ 69  
 De Laurentiis, A 81, 92, 288  
 De Lorenzo, M 227, 244  
 de los Santos, R 220  
 De Nicola, AF 76, 78, 94, 96, 97,  
     337  
 de Portela, ML 197, 199  
 de Rey, BM 151  
 De Rosa, G 59, 71  
 del Rey, A 131  
 del Río, PO 126  
 del Valle, HF 259  
 Della Valle, C 140, 141  
 Demasi, G 267  
 Dematteis, A 157, 158, 172, 181  
 Denduchis, B 83, 169  
 Depino, A 142  
 Deroche, A 145  
 di Gianni, PD 319  
 Di Loreto, V 340  
 Di Masso, R 343  
 Di Rienzo, A 102  
 Di Rienzo, M 261  
 Di Risio, C 10  
 Di Risio, CCB de 237  
 Diamant, M 230, 231  
 Díaz, D 86  
 Díaz, ES 23, 207  
 Díaz, M del C 81, 288  
 Díaz, S 83  
 Digirolamo, G 220  
 Dodelson de Kremer, R 290  
 Dokmetjian, J 140, 141  
 Dolcini, GL 123, 124  
 Domené, HM 279

- Dominici, F 333  
 Donaldson, MJ 162  
 Donoso, A 82, 253  
 Dorfman, V 235  
 Dubin, M 210  
 Dubner, D 11, 99  
 Duvilanski, BH 81, 85, 92, 288
- Edelstein, N 208  
 Eiján, AM 232, 234  
 Elías, MM 55, 65, 66, 67, 72, 219  
 Elizalde, PV 228, 236, 242, 311  
 Ellerman, D 172  
 Encabo, H 294  
 Enders, JE 80, 117, 120  
 Engel, N 308  
 Ennis, I 250  
 Enriquez de Salamanca, R 217  
 Enriquez, A 11  
 Ermácora, MR 282  
 Escalada, A 229  
 Escobar, ME 33, 278  
 Esnarriaga, JM 184  
 Espada, J 234  
 Esquivino, AI 89, 91, 134  
 Esteban, EN 123, 124  
 Esteban, L 335  
 Etcheverry, SB 347, 348
- Fabris, V 314  
 Fainstein, I 299  
 Falbo, A 78  
 Faletti, AG 23, 176, 207  
 Farías, CE 1, 8, 14, 21  
 Farías, EF 301, 312  
 Farina, HG 227  
 Farrán, M 292  
 Fasulo, V 40  
 Favre, C 39, 48, 189, 191  
 Fay, F 122  
 Feig, L 301  
 Feldman, S 119  
 Feleder, C 88, 90  
 Feliú, MS 194  
 Fellet, A 252  
 Ferder, L 54, 61, 204, 222  
 Fernández, AR 80, 117, 120  
 Fernández, BE 24, 56, 253  
 Fernández, H 258  
 Fernández, I 49  
 Fernández, M 209  
 Ferrer, JF 123, 124  
 Ferrería, JC 126  
 Ferrero, A 69
- Ferretti, JL 334, 336, 345, 346, 349  
 Ferreyra, G 292  
 Ferrini, M 78, 94, 96, 337  
 Figuerola, M de L 298  
 Fink, N 15  
 Finkelstein, S 275  
 Finkelstein, CV 22, 202, 283  
 Finocchietto, PV 46  
 Fiol de Cuneo, M 173, 174, 175,  
     203, 223  
 Fischman, ML 74  
 Fiszer de Plazas, S 104, 297  
 Fiszman, ML 30  
 Flaherty, P 184  
 Fleischman, S 199  
 Fogel, D 284  
 Fondevila, C 5  
 Font, MT 343  
 Fossati, A 249  
 Foster, DF 312  
 Fraga, AR 57  
 Fraga, CG 54, 204, 224  
 Fraix, T 332  
 Franchi, A 34  
 Francisco, V 146  
 Franco, M 305, 319  
 Frankel, P 301, 312  
 Frontera, M 78  
 Frungieri, M 171  
 Fu, G 25  
 Fukuda, H 316  
 Fundia, A 276, 324  
 Furno, G 195
- Gabri, MR 227  
 Gadamo, A 201  
 Gandolfo, C 298  
 Garbossa, G 10  
 García Rudaz, C 278  
 García, A 268  
 García, C 230, 231  
 García, F 268  
 García, G 119  
 García, M 197, 199  
 García, SI 247, 258, 275  
 García, SL 334  
 García, SS 57, 76  
 García, VMC 67, 72  
 Gargiulo, A 6  
 Garraza, M 35  
 Gatto, EM 100, 110  
 Gaubeca-Klix, E 354  
 Gavotto, A 208, 260  
 Gayol, MC 12  
 Gea, S 120
- Geffner, JR 136  
 Genaro, AM 98, 153, 154, 155, 205,  
     270, 277, 295  
 Gennari, L 18, 20  
 Gerez, E 240  
 Ghanem, C 193  
 Ghisolfi, C 193  
 Giardina, R 245  
 Giere, I 3  
 Gigli, I 330  
 Giglio, J 298  
 Giménez Segura, G 347  
 Giménez, MS 7, 45, 212  
 Gimeno, MAF 34, 159, 176  
 Gioffre, A 251, 252  
 Girardi, G 65, 66  
 Gisone, P 9, 11, 99  
 Goin, JC 38, 246, 249  
 Goin, M 228, 242, 311  
 Goldberg, V 130  
 Goldman, A 145  
 Goldszmid, R 303  
 Gomez Alvis, A 256, 263, 264, 265  
 Gómez Carrillo, M 239  
 Gómez, DE 226, 227, 244  
 Gómez, E 102, 293  
 Gómez, JC 324  
 Gomez, N 45  
 Goñi, G 13  
 González Bosc, L 251, 325, 331  
 González Deniselle, MC 96  
 González Iglesias, A 85  
 González Perrett, S 63  
 González Zuelgaray, J 271  
 González, AI 185  
 González, C 258, 275  
 González, M 237  
 González, SL 97  
 González-Calvar, S 171  
 González-Echeverría, F 135  
 González Flecha, L 177  
 Gorelik, G 248, 249, 273  
 Grassi de Gende, A 256, 263, 264,  
     265  
 Grassini, P 215  
 Gravielle, MC 297  
 Gravisaco, MJ 229  
 Grillo, C 76, 94, 337  
 Grimaudo SA 142  
 Gritti, MFL 150  
 Grönvik, KO 152  
 Groome, N 75  
 Grosman, C 63  
 Grosso, C 290  
 Grosso, S 19, 20  
 Grunfeld, B 247, 275

- Matos, E 320  
 Maugeri, N 4, 16, 17, 257  
 Maxit, A 101  
 Mazza, O 59  
 McCann, SM 23, 87, 207  
 McCarthy, AD 347, 348  
 Mediavilla, MG 190  
 Medina, J 280  
 Meiss, RP 243, 305, 316  
 Mendeluk, G 177  
 Méndez, G 144, 148, 182  
 Méndez, M 292  
 Mengarelli, G 13  
 Merlo, A 102, 293  
 Meroni, S 156, 167, 168  
 Meschengieser, S 5, 14  
 Meta, MD 345, 346  
 Michelin, S 11, 99  
 Mignone, IRR de 338  
 Milesi, V 256, 263, 264, 265  
 Miller, WL 25  
 Miño, J 102, 193  
 Miranda, M 112  
 Miranda, PV 135  
 Mitridate de Novara, A 297  
 Mogilevsky, JA 88, 90, 93, 95, 353  
 Moiguer, S 30  
 Molinari de Rey, B 238  
 Molinari, C 77, 351  
 Molinas, FC 2  
 Molinolo, A 313, 314, 315  
 Monasterolo, LA 219  
 Monastral, L 38  
 Mongini, C 229  
 Montagna, G 68, 214  
 Montecchia, M 314, 315  
 Montenegro, S 64, 339  
 Monti, JA 39, 48, 189, 191  
 Monticelli, MA 122  
 Montoreano, C 9  
 Morales, P 159  
 Morán, C 324  
 Morandi, A 320  
 Mordoh, J 233, 280, 303, 306, 307,  
     309  
 Morelli, L 103  
 Moreno, J 138  
 Morisoli, L 64  
 Morosano, M 335  
 Morvillo, V 233  
 Mosekilde, L 346  
 Mottino, AD 42, 51, 187  
 Moya, M 208, 260  
 Muchnik, G 122, 125  
 Muchnik, S 326  
 Muñoz de Toro, M 245  
 Muñoz, AA 56  
 Muramatsu, H 292  
 Murer, MG 285, 291  
 Muro, A 302  
 Nacht, S 90, 95  
 Nahmod, VE 136  
 Nanni, M 4, 16, 257  
 Narbaitz, M 4  
 Navas, A 339  
 Navia, D 262  
 Negroni, JA 259  
 Nepomnaschy, I 145, 146  
 Nesse, A 10  
 Neuman, I 202, 283  
 Niemeyer, GT 349  
 Nogués, M 294, 296  
 Noher de Halac, I 290  
 Novella, ML 157, 181  
 Novoa Bermúdez, MJ 49  
 Nyberg, C 58, 59, 61, 71, 73, 206,  
     222  
 Ochoa, E 55, 62, 67, 72  
 Oddo, E 53  
 Ojeda, MS 45  
 Oknaián, S 86  
 Oliveri, P 221  
 Olivero, O 226  
 Oliveros, LB 36  
 Olivieri, L 240  
 Olmos, S 147  
 Olsen, A 301, 312  
 Orellano, EG 183  
 Orihuela, D 198  
 Ortega Soler, CR 197, 199  
 Ortí, E 220  
 Ortiz, M 325, 331  
 Otaso, JC 201  
 Otero, H 344  
 Otero, J 239  
 Otoya, R 82  
 Oubiña, G 193  
 Páez Pereda, M 281  
 Pagano, E 314  
 Pagano, P 58, 59, 61, 73, 206, 209,  
     211, 222  
 Pagliero, F 341  
 Paglini, P 80, 117, 120  
 Palacios, F 144  
 Palermo, J 318  
 Pallaro, A 49  
 Pallotta, G 320  
 Palma, JA 80, 120, 208, 260,  
 Palmieri, MA 238  
 Palumbo, E 69  
 Pampillo, M 288  
 Panizzo, SD 79  
 Papouchado, ML 209, 211, 282  
 Parati, G 261  
 Parborell, F 29  
 Parera, V 292  
 Pargament, G 100  
 Pascolo, L 190  
 Pasqualini, RS 162, 179  
 Pastorale, C 341  
 Paulí, M 149  
 Pavia, MA 287  
 Pavón, H 298  
 Paz, C 84, 283  
 Paz, J 109  
 Pazo, JH 285, 291  
 Pecci Saavedra, J 251, 325  
 Pedrazzini, E 3  
 Pellegrino, JM 44  
 Pellizzari, E 156, 167, 168, 170  
 Pelusa, F 137, 139  
 Peña, D 128  
 Pennisi, P 166  
 Pera, L 335  
 Peralta, JG 254  
 Perassi, N 80  
 Pérazzo, S 239  
 Pereira, RD 164  
 Pereyra, Y 136  
 Pérez Bianco, R 121, 148  
 Pérez Castro, C 281  
 Pérez Leirós, C 132, 133, 205, 218,  
     273  
 Pérez Martínez, S 34  
 Pérez Martínez, S 159, 176  
 Pérez, G 10  
 Pérez, M del R 11, 99  
 Perí, S 15  
 Perone, MJ 26  
 Peruzzo, MC 56  
 Peters, G 242, 311  
 Pezzotto, SM 322  
 Piazza, A 161  
 Piazzon, I 145, 146  
 Piazzon, MI 319  
 Picchio, G 121  
 Pico, J 220  
 Pignataro, L 104  
 Pignataro, O 323, 355  
 Piñero, L 9  
 Pirola, CJ 57, 247, 258, 275  
 Pirola, G 78, 94, 178, 337

- Pisani, G 192  
 Pisera, D 81, 92, 288,  
 Pitossi, F 131  
 Plotkin, H 334  
 Plotkin, L 60, 344  
 Plotquin, Y 258, 275  
 Poderoso, C 84, 254  
 Poderoso, JJ 46, 100, 110, 116,  
     202, 254  
 Podestá, EJ 22, 84, 202, 283  
 Podhajcer, O 225, 280  
 Podrez Yaniz, MS 9  
 Polak de Fried, E 161  
 Poletto, L 322  
 Ponce, AA 173, 174, 175, 203, 223  
 Ponce, RH 163, 164, 181  
 Ponzio, MF 173  
 Ponzo, OJ 95, 200, 353  
 Portela, P 233, 306, 309  
 Porto, PI 57, 247, 258, 275  
 Poskus, E 282  
 Povedano, G 298  
 Prat, MI 103  
 Princ, F 101  
 Puche, RC 335, 340, 357  
 Puricelli, L 236, 302, 318, 320  
 Puyó, AM 24, 253
- Quintana, A 43, 196  
 Quintans, CJ 162, 179  
 Quiroz, R 122
- Raiden, S 136  
 Ramírez, AJ 261  
 Randi A 178  
 Ranuncolo, S 320  
 Rasia, M 12, 13  
 Rastrilla, A 27  
 Rebollo, A 256, 263, 264, 265  
 Recondo, MF de 293  
 Refojo, D 88, 90  
 Reginatto, R 262  
 Reiners, C 345  
 Reisin, IL 63  
 Rela, L 108  
 Resnik, R 200  
 Rettori, V 23, 83, 87, 93, 207  
 Revelli, S 119  
 Rey-Roldán, E 356  
 Ricart, KC 30  
 Ricci, RC 338  
 Riccomi, R 137  
 Riera, L 113, 114  
 Rigalli, A 335, 357
- Rinaldi, GJ 262, 263, 265  
 Riobó, N 100, 110  
 Riquelme, LA 285, 291  
 Risk, M 261  
 Rivarola, HW 120  
 Rivarola, MA 86, 160, 165, 180  
 Rivera, E 308  
 Rivero, A 296  
 Robinson, A 11  
 Rocchi, V 298  
 Rodriguez Garay, EA 44, 50, 192  
 Rodriguez, G 192  
 Rodriguez, H 25  
 Rodriguez, J 196  
 Rodriguez, JL 79, 300  
 Rodriguez, JV 43, 188, 195  
 Rodriguez, NL 123, 124  
 Rodriguez, R 338  
 Roggero, E 343  
 Roig, P 94, 337  
 Roldán, AG 96  
 Roldán, E 344  
 Roma, MG 37, 186  
 Román, R 102  
 Rondina, D 93, 95, 200, 353,  
 Rosenberg, C 15  
 Rosignoli, F 205, 218  
 Rosón, MI 69  
 Rossi, A 192  
 Rossi, J 137  
 Roux, ME 129, 147  
 Rozados, V 310  
 Rozenberg, G 234  
 Ruarte, MB 106, 107  
 Rubio, MC 171, 193, 215  
 Ruggiero, RA 305, 319  
 Ruibal-Ares, B 144, 148  
 Ruiz, RD 173, 174, 175, 203, 223  
 Rulli, SB 170  
 Rumi, LS 150
- Saadía, D 294  
 Saavedra, C 113, 114  
 Saball, DE 65, 138  
 Sabattini, M 113, 114  
 Saggese, J 298  
 Sagripanti, JL 118  
 Saidon, P 215  
 Salatino, M 228, 311  
 Sales, ME 143, 274,  
 Salgado, A 159  
 Salvarrey, M 66  
 Salvat, F 296  
 Salvi, J 201  
 Salviú, J 5
- Sambuelli, A 324  
 San Martín, MF 284  
 Sánchez Lockhart, M 229  
 Sánchez Pozzi, E 51, 187  
 Sánchez, RA 261  
 Sandoval, M 77, 351  
 Sanguineti, S 40  
 Sanjuan, N 115, 127, 239  
 Sansó, G 279  
 Santillán, ME 174, 175, 203, 223  
 Sanz, L 174  
 Saraco, N 86, 160, 165, 180  
 Sarano, J 6  
 Saravia, FE 76, 97, 337  
 Sarmiento, M 3  
 Sasetti, B 10  
 Savino, EA 267  
 Scacchi, P 93, 95, 200, 353  
 Scandizzi, A 43, 195  
 Scapini, C 39, 48, 189, 191  
 Scharovsky, OG 310  
 Schiafffi, J 309  
 Schiessl, H 349  
 Schneider, H 131  
 Schneider, P 345  
 Schöper, F 254  
 Schreier, L 40, 200  
 Schteingart, H 156, 166, 167, 168  
 Scolnik, M 144  
 Scrivo, D 54  
 Segura, ET 108, 289  
 Segura, EV 262  
 Segura, MJ 112  
 Seilicovich, A 81, 85, 92, 288  
 Seldes, A 318  
 Selgas, L 89, 134  
 Semeniuk, G 128  
 Serrani, RE 332  
 Sgarlata, C 60, 344  
 Shaurli, D 247, 275  
 Shaw, R 37, 186  
 Shöpfer, FJ 46  
 Sica, M 209, 211  
 Sica, REP 112  
 Silaf, MR 1, 8, 14, 21  
 Simes, J 208  
 Simsolo, R 247, 275  
 Skilton, G 227  
 Slavutsky, I 3, 307, 324  
 Slobodianik, NH 49, 194  
 Soding, N 268  
 Solanas, C 221  
 Solano, A 202, 283  
 Soraci, A 284  
 Sorribas, D 137  
 Sorroche, P 201

- Sosa, Z 28  
 Sotelo, A 31  
 Soto, J 122  
 Sottosanti, M 113, 114  
 Spengler, MI 13  
 Speziale, E 69  
 Speziale, N 69  
 Spinedi, E 26  
 Spinelli, S 196  
 Spitale, L 208, 260  
 Sragowicz, D 153  
 Stella, I 61, 222  
 Sterin-Borda, L 38, 132, 133, 143,  
     155, 205, 218, 246, 248, 249,  
     255, 269, 270, 273  
 Sternik, G 144  
 Stillitani, I 230, 231  
 Stone, V 37, 186  
 Stoppani, AOM 210  
 Storino, R 246, 271, 272  
 Stranieri, GM 205, 218  
 Stumpo, R 209, 211  
 Stutz, G 174, 175, 203, 223  
 Suárez, L 6  
 Suárez, M 80  
 Suescun, MO 75  
 Suligoy, MS 120  
 Susemihl, MC 338  
 Svetaz, MJ 119, 137  
 Swarcfarb, B 83, 93, 95, 353
- Taborda, D 332  
 Tamagno, B 332  
 Tapia, O 284  
 Taragano, F 109  
 Taratuto, AL 86  
 Tarrés, MC 64, 339  
 Tasat, DR 151  
 Tejera, A 244  
 Tesone, M 29  
 Testoni, G 267  
 Tezanos Pinto, M 148  
 Tezón, JG 135
- Theas, S 85, 92  
 Thyssen-Cano, SM 32  
 Tiribelli, C 190  
 Tiscornia, OM 47  
 Toblli, J 58, 59, 61, 71, 204, 206,  
     209, 211, 221, 222  
 Toffi, A 138  
 Toledo, J 53  
 Tomat, A 266  
 Toniolo, F 339  
 Tornese, E 293  
 Torrado, M 105  
 Torres, AM 68, 213, 214  
 Trbojevich, R 192  
 Trumper, L 219  
 Trvojevich, R 50  
 Tseng, KY 285, 291  
 Turyn, D 31, 333
- Urrutia, A 309  
 Urrutia, MI 271, 272  
 Urtreger, AJ 302
- Vaccaro, MI 47  
 Vada, JA 184  
 Valdez, SN 282  
 van Brussel, E 343  
 Vanzulli, S 242  
 Varas, S 7  
 Varela, A 267  
 Varela, C 5, 20  
 Varela, M 320  
 Vargas-Roig, L 317  
 Vasallú, P 2  
 Vatta, M 253  
 Vazquez, E 217, 240  
 Vázquez, SM 323  
 Vazquez-Levin, MH 135  
 Vega, GW 69  
 Vega, MC 97  
 Velardez, MO 81, 85  
 Velázquez, E 91
- Venosa, RA 327, 329  
 Vianello, SE 169  
 Vicenti, LM 174  
 Vidal, N 251, 325, 331  
 Viegas, MH 311  
 Viggiano, JM 34, 159  
 Vila-Echagüe, A 255, 269, 270  
 Villamil, A 201  
 Villanúa, MA 91  
 Villegas, L 27, 35  
 Vincenti, LM 175, 203, 223  
 Viola, MS 215  
 Vitale, M 130
- Waissman, J 125  
 Wald, MR 255  
 Waldner, C 229  
 Wassermann, A 54  
 Weinschelbaum-Jairala, S 62  
 Weissmann, P 261  
 Weisstaub, A 197  
 Werbajh, S 172  
 Wikinski, R 40, 41, 185, 200  
 Willnecker, J 349  
 Witis, M 105  
 Wolfmann, C 280  
 Woods, AI 8, 14, 17
- Yael, M 41  
 Yomha, R 309  
 Yorio, AA 289  
 Ytques, M 127
- Zanchetta, JR 334, 346  
 Zaninovich, AA 287  
 Zaninovich, RS 287  
 Zapiola, I 122, 125  
 Zelaschi, NM 79, 300  
 Zhang, G 25  
 Zizola, C 77, 351  
 Zwirner, N 249

- Esta publicación es una realización de: