

## COMUNICACIONES ORALES

## SESIONES ESPECIALES CON INVESTIGADORES FORMADOS

## OXIDO NITRICO, INFLAMACION Y CELULAS FAGOCITICAS

1. **Los neutrófilos humanos son células productoras de óxido nítrico y peroxinitrito.** María Cecilia Carreras, N. Riobó, G.A. Pargament, J.J. Poderoso.

*Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires.*

Previamente hemos demostrado que los neutrófilos humanos (PMN) producen óxido nítrico (NO) en reposo y tras la estimulación con agentes quimiotácticos (fMLP) o ésteres del forbol (PMA) (FEBS Lett. 341:65, 1994). La producción simultánea de NO y anión superóxido ( $O_2^-$ ) durante el estallido respiratorio conduce a la formación de anión peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), un poderoso oxidante responsable de la nitración de proteínas intra y extracelulares como la albúmina, proteínas mitocondriales y enzimas como la superóxido dismutasa produciendo cambios en su estructura y función. Hemos analizado la cinética de este proceso mediante el uso de inhibidores de la síntesis de NO y superóxido dismutasa lo cual nos ha permitido estudiar la contribución relativa de ambos compuestos ( $1 NO/5 O_2^-$ ). La formación de peroxinitrito con una constante de  $6.9 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$  dificulta la observación del metabolismo de NO en el neutrófilo, especialmente en ausencia de atrapadores del NO, lo que ha producido algunas divergencias con respecto a su producción por los neutrófilos humanos. La NADPH oxidasa y la NO sintasa comparten algunos caminos de transducción de señales para su activación e inactivación, ambas son activadas vía proteína quinasa C e inactivadas vía proteína quinasa A, pero la activación de tirosina quinasas produce la inactivación de la NO sintasa (Free Rad.Res. 26: 325, 1997). Esta disociación podría ser importante en la regulación del mecanismo de muerte celular programada de los PMN. En este sentido, hemos visto evidencias sobre la participación del NO sobre la apoptosis espontánea de los leucocitos polimorfonucleares. Los neutrófilos humanos pueden expresar NO sintasas (NOS) de tipo constitutivo e inducible. Recientemente, hemos observado la presencia de RNA mensajero de la NOS neuronal, el cual podría estar modificado en algunas patologías como la enfermedad de Parkinson, donde hemos detectado un aumento significativo de su expresión que se acompaña con el aumento de la velocidad de producción de NO por estas células activadas con PMA (Mov.Disord. 11: 261, 1996). Esta condición favorece la formación de peroxinitrito y la nitración de proteínas en los neutrófilos que podría explicar modificaciones en la transducción de señales intracelular en diversas patologías.

2. **Modulación de la actividad citotóxica de los granulocitos neutrófilos por óxido nítrico (NO).** Graciela Andonegui, A. Trevani, M. Giordano, J.Geffner.

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

Los granulocitos neutrófilos desarrollan su actividad inflamatoria en ambientes en los cuales se producen cantidades variables de NO, a expensas de NO sintasas (NOS) constitutivas y/o inducibles expresadas por diferentes tipos celulares. Nuestro objetivo básico consistió en evaluar "in vivo" e "in vitro", el im-

pacto del NO sobre la fisiología del granulocito neutrófilo. En experiencias desarrolladas en ratones Balb/c, observamos que los inhibidores de NOS (L-NAME o L-NNA, 50 mg/kg peso, una dosis) indujeron: a) una marcada neutrofilia, con pico a las 4 horas post-tratamiento y b) un notorio incremento en la adherencia de los neutrófilos al endotelio, de acuerdo a observaciones realizadas en cortes de pulmón. Ambos efectos fueron prevenidos por tratamiento simultáneo con L-arginina (250 mg/kg). No obstante, los inhibidores de NOS no fueron capaces de potenciar el reclutamiento de neutrófilos en pulmón, en respuesta a la instilación intratraqueal de agentes inflamógenos tales como el fMLP (J.Leuk.Biol. 58:391,1995). En un segundo grupo de experiencias analizamos el impacto del NO sobre la actividad citotóxica de los neutrófilos humanos. A tal efecto examinamos dos tipos diferentes de respuestas: la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) y las respuestas citotóxicas oxígeno-dependientes (inhibibles por catalasa) gatilladas por complejos inmunes y fMLP. Empleando como agentes dadores de NO el GSNO y el SNAP encontramos, en relación a la CCDA, una acción moduladora bifásica. Un efecto inhibitorio fue observado al emplear células blanco recubiertas por altas concentraciones de anticuerpos, mientras que un efecto amplificador fue observado empleando bajas concentraciones de anticuerpos. Ambos efectos fueron reproducidos por análogos del GMPc (Inmunología. 86: 646, 1995). En relación a la CCOx observamos una notoria actividad exacerbadora mediada por el NO, no reproducible por análogos del GMPc, asociada a: 1) un incremento en la producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno, 2) un incremento en la liberación de la enzima mieloperoxidasa (MPO) y 3) un "switch" en el mecanismo citotóxico desde una vía MPO-independiente a otra MPO-dependiente. Estos resultados indican que el NO es capaz de modular la actividad citotóxica de los granulocitos neutrófilos. El sentido de tal modulación así como también los mecanismos subyacentes a la misma se muestran dependientes de la función citotóxica analizada y de las propiedades del estímulo empleado.

3. **El óxido nítrico induce apoptosis en los macrófagos.** Eduardo G Lapetina.

*Molecular Cardiovascular Research Center, Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland, Ohio 44106-4958, USA.*

Los macrófagos juegan un papel muy importante en la respuesta inflamatoria del ser humano y responden a las moléculas que median inflamación como las citoquinas y los factores de crecimiento; asimismo, determinadas citoquinas son producidas por los macrófagos. El balance entre los macrófagos que acuden al foco inflamatorio y los que se destruyen es crítica para la resolución de la inflamación. Los macrófagos mueren por fenómenos de apoptosis, principalmente por la acción de óxido nítrico (NO); el NO tiene dos orígenes: el primero, por el aumento de expresión y actividad por estimulación de la enzima NO-sintetasa (NOS inducible) del macrófago y el segundo es aquel producido de forma exógena por células adyacentes o compuestos que liberan NO. El propósito de este estudio es la determinación de los mecanismos asociados a la apoptosis de macrófagos producida por el NO. Para ello utilizamos una línea de macrófagos que son sensibles a la apoptosis producida por el NO endógeno y una variante clonal de la primera caracterizada por ser resistente al NO producido

por células estimuladas con lipopolisacáridos e interferon-gamma. Paradójicamente, estas células resistentes al NO endógeno son muy sensibles al NO producido en forma exógena. Estas diferencias fenotípicas permiten delimitar los mecanismos bioquímicos que controlan la apoptosis y la resistencia a la apoptosis de los macrófagos. En el foco inflamatorio hay un porcentaje de macrófagos que son resistentes a la apoptosis y contribuyen a perpetuar la inflamación. La identificación de los fenómenos moleculares que producen resistencia a la apoptosis pueden llevar a obtener fármacos que modulen la inflamación. Los resultados que hemos obtenido que definen los mecanismos de apoptosis y la resistencia a la apoptosis serán discutidos durante esta presentación.

4. **Rol del óxido nítrico (NO) en la fisiopatología de la falla contráctil del músculo diafragmático en la sepsis.** J. Boczkowski, C. Lisdero, S. Lanone, M.C. Carreras, A. Boveris, M. Aubier, J.J. Poderoso.

*INSERM U408, Paris, Francia; Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires.*

La aparición de insuficiencia respiratoria durante las infecciones sistémicas (sepsis) es frecuente y condiciona el pronóstico de los pacientes. Una alteración de la contractilidad del diafragma, ha sido demostrada como un elemento clave en la génesis de la insuficiencia respiratoria durante la sepsis (Am. Rev. Respir. Dis. 198; 260, 1988; 142: 193, 1990). El objetivo de nuestro trabajo es investigar el rol del NO en la fisiopatología de la disfunción diafragmática en la sepsis. En una primera serie de estudios en ratas inoculadas con endotoxina de *Escherichia coli*, hemos observado que el NO sintetizado por la NOS2 inducida (NOS2) expresada en los miocitos diafragmáticos, es un mediador de la alteración de la contractilidad diafragmática (J.Clin. Invest. 98: 1550, 1996). En una segunda serie de estudios hemos investigado el mecanismo de este efecto del NO, tomando como eje su acción sobre la respiración mitocondrial. Los resultados obtenidos en ratas sépticas muestran que el NO sintetizado por la NOS2 diafragmática aumenta la formación mitocondrial de anión superóxido, que se combina con el NO para generar peroxinitrito. El peroxinitrito es el mediador del efecto del NO ya que produce la nitración las proteínas mitocondriales, lo que produce el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa mitocondrial y la falla contráctil muscular. Finalmente, en una tercera serie de estudios, hemos evaluado la expresión de la NOS2 en el diafragma humano. En estos trabajos, utilizando muestras musculares obtenidas a partir de autopsias de pacientes fallecidos de shock séptico, hemos confirmado la expresión de una NOS2 funcional en miocitos del diafragma y también del miocardio de ventrículo izquierdo. La expresión de la NOS2 está asociada a la formación intramuscular de peroxinitrito. Hemos encontrado resultados similares en el músculo recto mayor, obtenido durante laparotomía o toracotomía de pacientes sépticos. La intensidad de la expresión de la NOS2 está directamente correlacionada a la gravedad del estado séptico. Estos resultados muestran que el NO juega un rol en la fisiopatología de la falla contráctil de los músculos respiratorios en la sepsis, y sientan por ende, nuevas bases terapéuticas para tratar esta afección.

## INFECCIONES E INMUNOLOGIA

5. **Detección de infección por HIV en cultivo primario de células mononucleares periféricas (CMP) de pacientes hemofílicos HIV+.** Beatriz Ruibal-Ares, Liliana Belmonte, Graciela Méndez, Marta Felippo, Patricia Baré, María M.E. de Bracco.

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

El aislamiento del virus de la inmunodeficiencia adquirida (HIV) involucra generalmente estímulos exógenos que pueden favore-

cer la selección de las variables virales más adaptadas al sistema de cultivo, las cuales pueden no ser las de mayor relevancia en el paciente infectado. Recientemente hemos desarrollado un sistema de cultivo primario prolongado que favorece el contacto célula a célula y permite la diferenciación de monocitos/macrófagos (M/M) hasta alcanzar la formación de células gigantes multinucleadas (CGM). Utilizando esta técnica, detectamos la replicación de HIV (liberación de p24 al sobre-nadante, SN, por ELISA y carga viral por PCR) en 35/51 pacientes hemofílicos HIV+, estudiados repetidas veces a lo largo de cuatro años. En el 70% de los casos se detectó p24 en el SN entre los días 15-30 de cultivo. En pacientes que aún no habían desarrollado SIDA (Grupo B del CDC), o en asintomáticos infectados (Grupo A) las células positivas luego de 15 días de cultivo fueron de estirpe M/M y CGM. Fue posible observar M/M infectadas en pacientes con carga viral nula, después de más de un año de tratamiento antiretroviral combinado. En algunos pacientes, con SN p24+ (>150 pg/ml) desde el inicio del cultivo, también se detectaron linfocitos HIV+. En el 65% de los pacientes con SIDA (Grupo C3), los SN fueron débilmente positivos hasta el día 15, negativizándose a medida que el cultivo perdía viabilidad. En el 70% de los cultivos, especialmente en los pacientes de los grupos A2 y B2, a partir de los 40 días de cultivo, los linfocitos T y M/M eran reemplazados por células transformadas de estirpe B, y 50% de las líneas obtenidas eran HIV+. Los SN HIV+ resultaron infectivos para CMP normales cultivadas hasta 14 días con el mismo método, recuperando altos títulos de HIV macrófago-trópico. Después de los 40 días, también se obtuvieron líneas celulares B transformadas a partir de CMP normales infectadas con SN HIV+. Este sistema, de ejecución simple, puede resultar ideal para el estudio de los factores que condicionan la multiplicación de HIV en un individuo dado, para evaluar la persistencia de infección después del tratamiento antiviral combinado y para analizar las causas de la génesis de proliferación B neoplásica en los pacientes infectados por HIV. Esto último es importante, porque uno de los objetivos en el tratamiento de la infección por HIV, es prevenir el desarrollo, tanto de las infecciones oportunistas, como el de los linfomas B de alto grado frecuentes en el SIDA, que resultan fatales por su refractariedad al tratamiento.

6. **Factores genéticos celulares que pueden incidir en la evolución clínica de niños HIV-1 infectados por transmisión vertical.** Luisa Sen, A. Magano, J. Kopka, N. Batalla, R. Bologna\*.

*Laboratorio Biología Celular y Retrovirus, y \*Servicio de Infectología, Hospital de Pediatría J. P. Garrahan, Buenos Aires.*

La célula CD4+ para poder ser infectada por el HIV-1 debe expresar siempre un correceptor que pueda ser empleado por el virus. Los virus R5 y X4 emplean los receptores para quimioquinas CCR5 y CXCR4, respectivamente. Si bien el HIV-1 R5 es el involucrado en la transmisión, diferentes variantes virales pueden surgir a lo largo de la infección con el empleo promiscuo de correceptores, siendo el más frecuente el CXCR4, generalmente asociado con una aceleración en el descenso de los linfocitos T CD4+ y en la progresión a SIDA. Estudios genéticos moleculares descubrieron una delección de 32pb homocigota del gen CCR5 que impide la expresión del correceptor en la superficie celular, confiriendo una fuerte pero relativa resistencia a ser infectado por el HIV-1. En cambio, la heterocigosis del CCR5Δ32, aunque no impide la infección, es capaz de conferir un retraso en la progresión a SIDA. Otro determinante genético que podría estar asociado a una progresión lenta a SIDA es la presencia del alelo CCR2-64I. El CCR2 es considerado un correceptor poco empleado por el HIV-1, y el mecanismo por el cual puede ejercer la resistencia parcial aún no se conoce. El SDF-1 es el ligando natural para el CXCR4. Se ha postulado que la homocigosis para una mutación ubicada en la región no traducible 3' del gen SDF-1, podría estar asociado a un retraso en la progresión a SIDA. Actualmente los 3 factores genéticos celulares que podrían condicionar un retraso en el desarrollo a SIDA, se basan en estudios

realizados en adultos HIV-1 infectados y en la actualidad presentan una gran controversia. Nuestro objetivo fue estudiar en el SIDA infantil la influencia de los 3 factores genéticos celulares mencionados. Los resultados preliminares indican que la presencia de las variantes polimórficas del CCR5D32 y CCR2-641 en los niños HIV-1 infectados al ser comparados con los que poseen los genotipos salvajes para ambos correceptores, no modifican el tiempo libre de SIDA, pero pueden prolongar la sobrevida significativamente ( $p=0.013$ ). Por el contrario, en los niños infectados con la presencia del alelo mutado del gen SDF-1 (SDF-1 3'A) acelera significativamente el desarrollo a SIDA ( $p=0.0129$ ) y acorta la sobrevida ( $p=0.033$ ).

**7. La utilización del interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) en la infección aguda experimental con *Trypanosoma cruzi* en ratas.** S. Revelli, G. Dídoli, H. Dávila, E. Roggero, E. Piaggio, S. Feldman, O. Bottasso

*Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario.*

El IFN- $\gamma$  es una citocina esencial para la resistencia hacia patógenos intracelulares. Como tal, nuestro laboratorio ha venido desarrollando una serie de estudios experimentales en ratas donde el IFN- $\gamma$  recombinante es administrado a razón de 20.000 UI/día tras el desafío con *T. cruzi* ( $10^6$  tripomastigotes vía s.c.) a los 21 días de edad. Dicho procedimiento se reflejó en una infección aguda de menor severidad, que no se acompañaba de cambios en cuanto a los niveles circulantes de IFN- $\gamma$  endógeno y anticuerpos líticos anti-*T. cruzi*, aunque sí se verificó una significativa reducción en las concentraciones séricas de IL-6 biológicamente activa. Experimentos con macrófagos peritoneales demostraron, asimismo, que el tratamiento sistémico con IFN- $\gamma$  tornaba a estas células menos permisivas hacia la infección *in vitro* con el parásito sin que ello se correlacionara con una mayor producción de óxido nítrico (NO). En lo referente a los efectos a largo plazo la administración del IFN- $\gamma$  durante la enfermedad aguda logró revertir la inversión en el balance de células CD4:CD8 de la etapa crónica sin modificar la extensión y las características de la lesión inflamatoria miocárdica que se observa en un 60-70% de las ratas, a los 180 días p.i. El hecho de que el IFN- $\gamma$  más antimonio a la mitad de la dosis terapéutica había sido efectivo en la Leishmaniasis humana, nos alentó a estudiar la administración de IFN- $\gamma$  en combinación con dosis subóptimas y potencialmente menos tóxicas de benzimidazol -BZL- (20% de la dosis curativa mínima en ratas). Dicha estrategia permite un control casi total de la enfermedad aguda a la vez que modifica los niveles séricos de mediadores biológicos relevantes en el curso de la infección aguda, entre ellos los de NO<sub>2</sub> que aparecieron significativamente descendidos. Estudios *in vitro* para determinar si el BZL podía influir sobre la capacidad secretoria de células hospederas del *T. cruzi*, habían indicado que el BZL reducía la síntesis de NO por parte de macrófagos estimulados con LPS y/o IFN- $\gamma$ , vía de una inhibición en la transcripción del gen de la sintetasa inducible del NO. Por otro lado, en el intento de indagar sobre la potencial influencia del curso de una infección por *T. cruzi* con altos niveles de IFN- $\gamma$  durante la gestación, sobre la eventual infección de los hijos, se efectuaron estudios donde la infección con *T. cruzi* y el tratamiento con IFN- $\gamma$  en ratas preñadas hacía que sus crías se volvieran prácticamente resistentes a la infección homóloga inducida al destete; lo que estuvo asociado con una síntesis preferencial de IgG2b específica. Experimentos de intercambio de nodrizas indicaron que buena parte de dicha acción protectora se transmitía a través de la leche, puesto que crías nacidas de ratas sin tratar pero amamantadas por madres infectadas y tratadas con IFN- $\gamma$  durante la preñez, desarrollaban una enfermedad aguda muy atenuada.

**8. Actividad citotóxica T inducida por antígenos del *Mycobacterium leprae* en pacientes con lepra. Su regulación por citoquinas.** M. del C. Sasiain, S. de la Barrera, S. Fink, M. Finiasz, M. H. Fariña, G. Pizzariello, R. Valdez.

*Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina; Hospital de Clínicas José de San Martín, UBA*

La lepra es una enfermedad infecciosa crónica producida por el *Mycobacterium leprae* que presenta un amplio espectro clínico estrechamente relacionado con la inmunidad, con una anergia selectiva al *M. leprae* en los pacientes lepromatosos. Se producen episodios reaccionales que conducen al daño nervioso. El reservorio natural del *M. leprae* son los macrófagos y las células de Schwann. Si bien la lisis de estas células por linfocitos T citotóxicos (LTC) sería útil para la eliminación del reservorio, podría participar en el daño nervioso observado. Hemos demostrado que el *M. leprae* induce LTC capaces de lisar macrófagos autólogos que presentan antígenos micobacterianos. Los pacientes con lepra multibacilar (MB) desarrollan menor citotoxicidad (Cx) que los paucibacilares (PB) y controles normales (N). Al estudiar la modulación de los LTC por citoquinas se observó que el IFN $\gamma$  y la combinación de IL-6 e IFN $\gamma$  aumentaban la Cx en PB, MB y controles normales, mientras que la IL-4 inhibía dicha respuesta, pudiendo ser revertida por el agregado simultáneo de IFN $\gamma$ . Se observó que el *M. leprae* inducía LTC CD4 y CD8. En MB y en N, la Cx de la población CD4 era mayor, en cambio, en los PB predominaba la Cx a CD8. Las CKs IL-6, IL-2 o IFN $\gamma$  modularon de forma diferencial la Cx de ambas poblaciones linfocitarias en los pacientes con lepra, sugiriendo que la acción conjunta de IL-6 con IL-2 o IFN $\gamma$ , podrían tener un papel importante induciendo la generación de LTC específicos al *M. leprae* en MB. Entre los antígenos micobacterianos se encuentran las proteínas de shock calórico (heat shock proteins, hsp), conservadas a lo largo de la evolución y altamente inmunogénicas. Demostramos que los pacientes MB no generaban Cx a la hsp65 del *M. leprae*, sólo aquellos pacientes MB con episodios reaccionales generaban LTC hsp65 específicos. Los pacientes PB presentaron fuerte Cx a esta hsp. La falta de Cx en los MB fue revertido por el agregado exógeno de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-12 y la neutralización de IL-4 durante la generación de LTC. El TNF $\alpha$ , el IFN $\gamma$  e IL-12 debían estar presentes en las etapas tempranas de la estimulación antigénica para el completo desarrollo de Cx hsp65 específica, sugiriendo que la fuente temprana de estas citoquinas serían las células NK y/o los linfocitos T  $\gamma\delta$ . En trabajos realizados con CM deplecionadas de NK y T $\gamma\delta$ , observamos que estas células regularían la actividad citotóxica a través de su producción de citoquinas y/o generación de células citotóxicas NK-like.

**PROLIFERACION, TUMORIGENESIS Y PROGRESION TUMORAL**

**9. Una nueva función del complemento: su contribución a la proliferación y a las complicaciones de la diabetes.** J A Halperin.

*Harvard Medical School, Boston, MA, USA.*

La apertura transitoria del poro formado por el complejo de ataque del complemento (MAC) en membranas celulares libera factores de crecimiento (*J Exp Med*, 179:985, 1994; *Mol Med*, 2:755, 1996). Este hallazgo explica la frecuente asociación entre depósitos del MAC y la excesiva proliferación celular que se observa en los tejidos patológicos de muchas enfermedades proliferativas. Dado que el complemento estimula la proliferación celular y que la proteína reguladora del complemento CD59 restringe el depósito de MAC autólogo, postulamos que la ausencia o la inactivación de CD59 incrementaría tanto los depósitos del MAC como la proliferación celular asociada y que este mecanismo podría generar patologías proliferativas. Una proliferación celular patológica es característica de las complicaciones vasculares de la diabetes humana. Asimismo, el incremento de la glicación de proteínas que ocurre en esta enfermedad interfiere con la función de algunas proteínas. En consecuencia, investigamos si la glicación no enzimática del CD59 inactiva a esta proteína y contribuye de esta manera con la producción de las complicaciones vasculares de la diabetes. En

este trabajo presento evidencia experimental de que: 1) el sitio activo de CD59 contiene un sitio preferente de glicación (lys41-his44); 2) hay CD59 glicada en la orina humana indicando que la proteína es glicada *in vivo* 3) la glicación *in vitro* de CD59 purificado de glóbulos rojos humanos inhibe la actividad anticomplementaria del CD59 y 4) la mutación puntual del residuo lys41 del CD59 humano elimina la sensibilidad de la proteína a la inhibición por glicación; 5) existen depósitos del MAC en los glomérulos y arterias del rincón diabético. Estos hallazgos son consistentes con nuestra hipótesis que el complemento juega un papel patogénico en las complicaciones crónicas de la diabetes: la glicación inactiva al CD59, lo que genera un aumento en los depósitos del MAC con la consecuente liberación de factores de crecimiento del endotelio que resulta en mayor proliferación celular en la pared vascular. De particular interés es el hecho que el residuo his-44 del CD59 esta presente solo en la proteína humana y no en la de ninguna otra especie. Proponemos que esta peculiaridad del CD59 humano explica a nivel molecular la exclusiva propensión de los humanos a desarrollar complicaciones vasculares de la diabetes, las cuales no se observan en ninguna otra especie.

#### 10. Receptores hormonales y crecimiento tumoral en cáncer de mama murino. C Lamb, A Molinolo, Claudia Lanari.

*Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires*

En el laboratorio hemos generado varias líneas tumorales murinas *in vivo*, progesterógeno-dependientes (PD), que expresan receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP), a partir de carcinomas mamarios ductales metastásicos. De éstas obtuvimos variantes que no requieren del progesterógeno para crecer (progesterógeno-independientes; PI), las que siguen expresando receptores hormonales (Int J Cancer 43: 845-850, 1989; 49: 900-905, 1991 y 59: 196-203, 1994). La presencia de RP en líneas que no necesitan el ligando para proliferar, nos indujo a investigar qué papel juegan los receptores en tumores PI. Los objetivos de este trabajo fueron a) comparar los parámetros de unión al ligando de los RP en tumores PI y PD; b) investigar si en tumores PI el crecimiento es inhibido con antiprogesterógenos (AP) y con oligonucleótidos antisentido de RP (ASRP); c) investigar si en tumores PD la estimulación de crecimiento por bFGF o suero fetal bovino (SFB) en concentraciones crecientes, puede ser también inhibida por AP y ASRP. El análisis de RE y RP por técnicas bioquímicas no reveló diferencia de Kd ni de cantidad entre receptores de tumores PD y PI. En estudios *in vivo*, los tumores PI (n=3, 25-50 mm<sup>2</sup>) regresaron completamente o fueron inhibidos por tratamiento con los AP onapristona (10 mg/kg/día) o mifepristona (6,75 mg/kg/día). En cultivos primarios *in vitro*, el tratamiento con ASRP (20-0.16 mg/ml), inhibió la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina de las células tumorales (p<0.01) en condiciones en las que los oligonucleótidos sentido (control) no indujeron cambios. En cultivos primarios PD, el bFGF (100 ng/ml) o concentraciones crecientes de SFB estimularon la proliferación celular en forma análoga al acetato de medroxiprogesterona (MPA) 10 nM. Esta estimulación fue inhibida por onapristona y mifepristona, 10 nM, y por ASRP (20-0.16 mg/ml). La efectividad del ASRP para inhibir la síntesis de RP se demostró indirectamente en experimentos de unión de <sup>3</sup>H-R5020, donde se observó una disminución del 59,3±14% de pegado. Se demuestra que a) los parámetros de unión de los RE y RP son similares en tumores PD y PI, b) el crecimiento tumoral PI puede ser inhibido por antiprogesterógenos cuyo mecanismo de acción es diferente y por ASRP, c) el bFGF puede reemplazar al MPA en el crecimiento PD y el mismo puede ser inhibido por AP o ASRP. El RP es un punto primordial en la regulación del crecimiento. Aún en ausencia del ligando esta vía puede ser activada por caminos estimuladores alternativos, y esta posibilidad podría constituir uno de los caminos de la adquisición de la hormono-independencia.

#### 11. Modelo de carcinoma mamario inducido en ratas por la administración vía i.p de N-nitroso-N-metilurea (NMU). Elena Rivera, Gabriela Martín, Graciela Cricco, Claudia Cocco, C. Davio, Bibiana Lemos, C. Fitzsimons, Alicia Gutierrez, Rosa Bergoc.

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

Los tumores experimentales desarrollados en este modelo son carcinomas ductales, invasivos, poco metastásicos e histológicamente de variedad cribriforme, papilar o comedo carcinomas. La caracterización de distintos tipos de receptores indica que todos los tumores presentan receptores a estrógeno (RE), a progesterona (RPg), a prolactina (RPr), a factor de crecimiento epidérmico (REGF) e insulínico tipo I (RIGF-I) y receptores de tipo H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> a histamina (RH<sub>1</sub>, RH<sub>2</sub>). A través de la ovariectomía y estudios *in vivo* e *in vitro* se demuestra que el 40% de los tumores son dependientes del E<sub>2</sub> para su desarrollo y crecimiento (HD). Independientemente de su respuesta al E<sub>2</sub> todos son dependientes de histamina (His) y estimulados por EGF. Basándose en estas características el modelo resulta de gran utilidad para el estudio de mecanismos de acción de distintos factores reguladores del crecimiento. En este sentido, es el primer modelo experimental en que se ha demostrado la acción de la histamina como factor autocrino de crecimiento. La clave de este mecanismo la constituye a) cambios en la regulación de la expresión de la histidina decarboxilasa y contenido endógeno de His, que escapa del control estrógeno característico en la glándula mamaria normal y pasa a estar regulado por la His; b) cambios en la asociación de los RH<sub>1</sub> y RH<sub>2</sub> a los segundos mensajeros intracelulares, con la consecuente activación de vías metabólicas relacionadas con la proliferación. La dependencia hormonal de los tumores presenta características particulares. En los HD el E<sub>2</sub> regula la proliferación celular, la expresión de ARNm de RPg, y de c-myc. En los estrógeno independientes (HI) la expresión de c-myc y RPg no es modulada por E<sub>2</sub>, y el contenido de TGFa/EGF es regulado por Pg. La inducción de este modelo tumoral en ratas diabéticas (mediante la inyección de streptozotocina 90 mg/kg al 2º día de vida), demostró el desarrollo de tumores con marcado patrón de benignidad posibilitando el estudio de la interacción entre diferentes hormonas y factores de crecimiento, principalmente de tipo insulínico. Los tumores desarrollados en ratas diabéticas presentan RIGF-I los que se sobreexpresan en tumores HI. Finalmente, este modelo ha sido empleado con éxito para el desarrollo de drogas con actividad antiestrogénica, así como también para el estudio de efectos biológicos de radiaciones ionizantes. En este sentido se investiga actualmente la acción radiosensibilizante o radioprotectora de distintas drogas con potencial uso en radioterapia.

#### 12. Determinantes Críticos de la Progresión Tumoral. Elisa Bal de Kier Joffé, A. Urtreger, J. Aguirre Ghiso, Lydia Puricelli, Eugenia S. de Lustig, A. Muro, Fabiola Porro, S. Werbach, A. Kornblihtt.

*Area Investigación, Instituto de Oncología A.H. Roffo, ICGEB (Trieste, Italia) y Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.*

En diferentes etapas de la progresión tumoral la célula maligna establece interacciones con componentes de la matriz extracelular (ECM) como la fibronectina (FN), cuya alteración se ha vinculado con la adquisición de los fenotipos tumorigénico y metastásico. Hace unos años demostramos una correlación inversa entre la expresión de FN y el potencial metastásico en un modelo de adenocarcinomas mamarios murinos. Así, mientras que los cultivos primarios del tumor M3, moderadamente metastásico en pulmón, mostraban una ECM de FN y niveles elevados de ARNm, en los cultivos de la variante altamente metastásico MM3 no se detectó la red de FN fibrilar extracelular ni ARNm por mapeo con nucleasa S1, sin alteraciones a nivel del gen en ambos casos. Recientemente hemos estudiado las bases moleculares de esta falta de expresión de FN. Utilizando un método más sensible, como es RT-PCR, se pudo establecer que las células MM3 expresan niveles de ARNm de FN 40 veces menores que M3 y presentan un patrón alterado de splicing alternativo. El análisis conformacional de ADN de simple cadena (SSCA) no mostró alteraciones en la secuencia de bases del promotor proximal. Me-

dante transfecciones transitorias con construcciones del promotor de FN y el gen reporter CAT, demostramos que los bajos niveles de ARNm FN se deben a una reducción de la transcripción que involucra la participación de la región 220 bp del promotor proximal. Por otra parte, la línea LM3, obtenida a partir de M3, perdió su capacidad de expresar FN a partir del repique 30, asociándose esta pérdida con la adquisición de un fenotipo más invasivo y metastásico. La línea celular LMM3, derivada de MM3 e incapaz de expresar FN, fue transfectada mediante diferentes construcciones del gen de FN plasmática humana. Se obtuvieron clones capaces de expresar FNwt o FN con mutaciones a nivel del principal sitio de unión a células RGD, que fueron detectadas a nivel citoplasmático o en el medio de cultivo, pero no en la ECM. La re-expresión de FN, wt o mutada, se asoció con una mayor adhesión a plástico, pero no a FN, con alteraciones en la producción de uroquinasa y con una inhibición de la migración y de la angiogénesis. Finalmente, la inoculación de los clones en ratones singeneicos mostró una significativa reducción en la capacidad metastásica asociada a la re-expresión de FN, pero independiente de RGD y de la formación de ECM. Nuestros resultados aportan nuevas evidencias que avalan la participación de la FN como determinante molecular crítica de la progresión tumoral.

## FISIOLOGIA Y PATOLOGIA DE RECONOCIMIENTO ANTIGENO

13. **Inmunogenética de la hepatitis autoinmune.** L. Fainboim #, M. Pando #, J. Larriba #, A. Roy\*, C. Velasco\*\*, L. Satz#, M. Ciocca\*\*, M. Zelazko\*.

*Division Inmunogenética. Hospital de Clínicas# y Servicio de Inmunología\* Hepatología\*\*, Hospital Garrahan, Buenos Aires*

La susceptibilidad a padecer una hepatitis autoinmune presenta asociaciones HLA diferentes de acuerdo a la población en estudio. En Japón, donde se ha observado una asociación con el haplotipo DR4 y DR2, se postuló al aminoácido 13 de la cadena DRb como responsable de la susceptibilidad. En población anglosajona, la asociación primaria fue con el haplotipo DR3 y en forma secundaria al haplotipo DR4. Se atribuyó a los residuos Glu 9, Leu 67 y Lys 71 de la cadena DRb una participación en la presentación de los autoantígenos relevantes. Previamente demostramos que la forma péptidica de AH (PAH) presenta una fuerte asociación con el haplotipo HLA-DRB1\*1301-DQB1\*0603. Ahora demostramos que en PAH la asociación primaria es con el locus DRB1, siendo el alelo DRB1\*1301 responsable de la susceptibilidad, con una asociación secundaria con el alelo DRB1\*03. En este mismo estudio, pudo demostrarse que el alelo DRB1\*1302 conferiría protección. Esto nos lleva a postular que la Val 86 de DRb que forma parte del 1er bolsillo de unión al péptido estaría involucrada en la susceptibilidad. Del estudio de otros residuos presentes en los alelos de riesgo, proponemos que la Tyr 10 y la Ser 11 del 3er bolsillo y la Ser 13 del 2º bolsillo estarían fuertemente involucradas en la susceptibilidad. El análisis conjunto de estos residuos mostraron que estos se encuentran en el 85% de los HAI-P vs 37% de los controles (RR9.3,  $p < 10^{-14}$ , FE 76%). Este estudio también demostró que las formas adultas de HAI tienen una diferente asociación genética y podrían representar una diferente etiopatología. El virus de la hepatitis A (HAV) ha sido implicado como desencadenante de la hepatitis autoinmune (HA) de tipo I. Dado que el VHA es endémico en esta región se estudió la asociación del HLA con formas auto-límitantes (FAL) y formas prolongadas (FP) de infección por VHA (anti HAV-IgM+ con una duración superior a las 12 semanas). Se detectaron por IFI anti-ANA, anti-actina y anti-LKM en cortes de riñón, estómago e hígado de rata. En 61 pacientes con FAL, la tipificación HLA mostró una asociación significativa con el alelo DRB1\*14 ( $p = 0.0009$ ) y DRB1\*09. Solo esta fue significativa luego de la corrección. Un 47% de las Fal presentaron acs anti-actina. No asociación con HLA pudo observarse en este subgrupo. En las formas prolongadas, a

los 3 meses, todos mantenían, enzimas elevadas, 18/21 presentaban hipergamia y 16/21 (76%) anticuerpos anti-actina. El 50% de las formas prolongadas ( $n = 11$ ) mostró la presencia del haplotipo DRB1\*1301 (8% en los controles, (RR 11,  $X^2$  23.8,  $p = 0.00002$ ). Al cabo de 48 meses de seguimiento clínico, ningún paciente con FP desarrolló una HAI. Se concluye que el daño hepático producido por el VHA se acompaña en un porcentaje elevado de pacientes de la presencia de anticuerpos anti-actina. Sin embargo, la infección autolimitada se mostró asociada a un haplotipo HLA diferente del que se asocia con las formas prolongadas. Esta asociación es la misma que acompaña a los pacientes con PAH, apoyando la hipótesis de que en individuos susceptibles el VHA jugaría un papel en el desencadenamiento de la enfermedad. Sin embargo, la ausencia de AIH en esta población ilustra la participación de otros factores, hasta ahora desconocidos.

14. **Efecto de la infección viral sobre la respuesta inmune humoral.** Lilia A. Retegui, Karina A. Gómez, Jean-Paul Coutelier.

*IQUIFIB (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires, e Instituto Internacional de Patología Celular, Bruselas, Bélgica.*

El virus elevador de la lactato deshidrogenasa (LDV) produce una infección persistente aunque asintomática, e induce una hipergamaglobulinemia en la que predominan los anticuerpos (Ab) de la subclase IgG2a. Nos preguntamos si este virus también producía una modificación en la especificidad de la respuesta inmune, es decir si alteraba el repertorio de Ab dirigidos contra un determinado inmunógeno, en nuestro caso la hormona de crecimiento humana (hGH). Ratonos de las cepas CBA/Ht y BALB/c fueron infectados con LDV e inmunizados con hGH. En los respectivos sueros se midieron las poblaciones de Ab mejoradores e inhibidores contra tres epítopes de la hormona, definidos por otros tantos anticuerpos monoclonales. Los resultados indicaron que la infección con LDV produce la desaparición de dichas poblaciones de Ab en los animales de la cepa CBA/Ht, mientras que no se observaron cambios en la respuesta anti-hGH en los ratones BALB/c. Por ELISA de competición se determinó que los ratones CBA/Ht infectados presentaban preferencialmente Ab dirigidos contra epítopes crípticos de la hGH; por el contrario, tanto en los ratones BALB/c controles como infectados se detectaron Ab contra epítopes nativos. Se concluyó que el LDV afectaría la respuesta inmune humoral en la cepa CBA/Ht, suprimiendo los Ab dirigidos contra epítopes nativos del Ag y/o induciendo la aparición de Ab que reconocen epítopes crípticos. Puesto que se había demostrado que el LDV aumentaba la respuesta autoinmune en ratones inmunizados con glóbulos rojos de rata, y teniendo en cuenta nuestras observaciones previas, comenzamos a estudiar la posible relación entre la inducción de autoanticuerpos y la exposición de epítopes crípticos. Hemos hallado que los sueros de ratones CBA/Ht infectados con LDV presentan Ab que reconocen Ag tisulares, mientras que los ratones BALB/c no producen Ab órgano-específicos luego de la infección viral. Determinamos que el patrón de reactividad de los Ab varía notablemente de un individuo a otro y que la mayoría de los autoanticuerpos están dirigidos contra epítopes crípticos. Estas observaciones indicarían que un agente infeccioso puede alterar la exposición de neoantígenos y por lo tanto inducir una respuesta autoinmune en individuos susceptibles.

15. **Prostatitis autoinmune experimental.** Clelia María Riera.

*Inmunología. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.*

Las prostatitis crónicas inflamatorias de origen no-infeccioso son a menudo difíciles de diagnosticar y aún más difíciles de tratar. La prostatitis autoinmune experimental (PAE) es una enfermedad que puede ser considerada un modelo experimental de prostatitis humana no-bacteriana. En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo experimental de prostatitis inmunizando ratas macho de la cepa Wistar con extracto salino de glándulas

accesorias de rata (RAG) en un adyuvante adecuado. La prostatitis observada en los animales inmunizados se desarrolla como consecuencia de la respuesta autoinmune contra antígenos de RAG y la lesión histológica es muy similar a la inflamación prostática observada en la enfermedad humana. En nuestro laboratorio se purificó un autoantígeno de RAG reconocido por autoanticuerpos inducidos en rata. El análisis de la secuencia de aminoácidos permitió identificar a la proteína purificada como prostateína (PR) o «rat prostatic steroid binding protein», miembro de la superfamilia de la uteroglobina. Prostateína fue reconocida no solamente por la respuesta autoinmune humoral, sino también por la respuesta autoinmune celular. Además, prostateína no es solo la molécula blanco de la respuesta autoinmune en animales inmunizados con RAG, sino que es además un antígeno inductor de la enfermedad. En efecto, prostateína purificada e incorporada a un adyuvante adecuado induce respuesta autoinmune humoral, celular y lesión en la glándula prostática. La identificación de uno de los antígenos blanco de la prostatitis autoinmune le ha dado un importante impulso a nuestro modelo de trabajo, el cual puede servir para tener un mejor conocimiento de la etiología, patogénesis y patofisiología de la prostatitis no-bacteriana. Prostateína es la glicoproteína más abundante en la próstata ventral de rata, de donde es secretada por las células epiteliales al fluido seminal. Es una proteína específica de órgano y de especie, y hasta el momento no se han hallado genes homólogos en otras especies. Actualmente se sabe que pertenece a la familia de las uteroglobinas, proteínas con alta capacidad antiinflamatoria, que se piensa suprimen la antigenicidad del embrión en estadios tempranos de su implantación. La función real de esta proteína no se conoce. Dado que el fluido seminal tiene un fuerte efecto inmunosupresor y el hecho de que uteroglobina posee actividad antiinflamatoria, nuestros estudios continuaron tratando de determinar las funciones inmunoregulatorias de la PR. Se observó que PR inhibe la respuesta proliferativa de células mononucleares de bazo de rata, ratón y humanos frente a mitógenos inespecíficos (Con A y PHA), la secreción de IL2 en los sobrenadantes de cultivo y la expresión del receptor de IL2. Los resultados presentados indican que la PR es un efectivo regulador de la función inmune y ofrecen una atractiva explicación para el efecto inmunosupresor del fluido seminal.

**16. Papel de las moléculas de adhesión en auto-inmunidad. Modelo experimental de orquitis autoinmune.** L. Lustig.

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

La activación, migración y extravasación de los leucocitos a los sitios de inflamación depende de la capacidad de estas células de adherirse a otras células y a la matriz extracelular. Las moléculas de adhesión (CAM's) juegan un importante papel en dichas interacciones. El inicio y desarrollo de un cuadro autoinmune está ligado a un cambio en la expresión de las CAM's. Aunque hay diferencias entre los distintos cuadros autoinmunes, las CAM's mas involucradas pertenecen a las familias de las selectinas, integrinas y superfamilia de las Ig. Algunas de estas moléculas son blancos potenciales para el desarrollo de terapias anti-inflamatorias al inducir efectos anti-adhesivos e inmunosupresores. En muchos cuadros autoinmunes la expresión de VLA-4 (integrina  $\beta$ 1), LFA-1 (integrina  $\beta$ 2) e ICAM-1 (superfamilia Ig) está asociada a la migración leucocitaria y a la destrucción tisular, lo que indica que estas moléculas intervienen en la inducción y en la cronicidad de la enfermedad. Por ej., en cuadros de tiroiditis autoinmune, artritis reumatoidea o encefalitis alérgica experimental, se observó un aumento en la expresión de VLA-4 y LFA-1 en los linfocitos del infiltrado celular y de ICAM-1 en el endotelio de los capilares y, en forma aberrante, en células parenquimatosas, del órgano blanco, inducida por citoquinas. En relación al testículo, es conocido el hecho de que, normalmente prevalece en este órgano un estado inmunosupresor. Esto puede deberse a distintos factores como: las características de los capilares, la existencia de una barrera hemato-testicular, la falta de células presentadoras de antígeno (APC) funcionales, la secreción por parte de las células de Sertoli y de Leydig de sustancias inmunosupresoras, la baja expresión de antígenos del CMH en las células germinales y el número reducido de linfocitos, con una relativa alta proporción de linfocitos T supresores. Resultados nuestros y de otros autores indican que en la orquitis autoinmune (OAE) se activa el sistema inmunológico ya que se producen cambios funcionales de las APC, los linfomonocitos activados migran al intersticio testicular y finalmente, ocurre la destrucción de las células del epitelio germinal (células blanco). Hemos estudiado por técnicas inmunohistoquímicas y citometría de flujo, la expresión de ciertas CAM's, en el testículo normal y en la OAE inducida en ratas con antígenos espermáticos y adyuvantes. No se observaron variaciones en la expresión de ICAM-1 y LFA-1 en linfocitos de sangre y de ganglios linfáticos en ratas con OAE, en relación a ratas controles. Sin embargo, una mayor distribución e intensidad en la expresión de ICAM-1, LFA-1, VLA-4 y V-CAM se detectó en el testículo a distintos tiempos del desarrollo de la OAE, sugiriendo que dichas CAM's, activadas en el micro-ambiente testicular, participan en el desarrollo de la lesión tisular.

## RESUMENES DE LAS COMUNICACIONES ORALES

HEMATOLOGIA I  
FISIOPATOLOGIA PLAQUETARIA

17. **Efecto de la trombopoyetina (TPO) y del factor estimulador de colonias granulocíticas (G-CSF) sobre plaquetas.** R. Pozner, M. Schattner, G. Collado, A. Gorostizaga, M. A. Lazzari

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

TPO y G-CSF podrían ser utilizados en forma simultánea en pacientes con aplasia medular. Evaluamos el efecto de ambas citoquinas en plaquetas. La adición de TPO o G-CSF a un plasma rico en plaquetas no produjo agregación ni liberación de ATP. La agregación primaria por ADP se transformó en una respuesta irreversible (n=5) con liberación de ATP ( $2 \pm 0.8$  mM, n=3) si las plaquetas fueron preincubadas con TPO. La preincubación con G-CSF no modificó los valores de agregación y de ATP inducidos por ADP o por ADP+TPO. La expresión basal de GPIIb (mediana de la intensidad de fluorescencia) ( $67 \pm 3$ , n=7) medida por citometría de flujo, disminuyó por estimulación con TPO ( $54 \pm 3$ ), G-CSF ( $58 \pm 3$ ) o TPO+G-CSF ( $48 \pm 2$ ). La expresión de GPIIb no se modificó por tratamiento similar. La preincubación de plaquetas con TPO aumentó el porcentaje de células positivas para P-selectina inducidas por una concentración subumbral de trombina ( $15 \pm 2$  y  $9 \pm 1$  respectivamente, n=5). El G-CSF ( $7 \pm 2$ ) no tuvo efecto y ambas citoquinas reproducen la acción del TPO ( $14 \pm 2$ ). El efecto de activación celular obtenido por TPO sobre plaquetas no se modifica por la presencia de simultánea de G-CSF.

18. **Niveles de expresión y proteicos de receptor soluble de Interleuquina 6 en pacientes con trombocitemia esencial.** Rosana F. Marta, C.J. Pirola, Laura I. Kornblith, Paola R. Lev, Felisa C. Molinas

*Instituto de Investigaciones Médicas, Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, UBA*

La trombocitemia esencial (TE) es una enfermedad mieloproliferativa clonal en la que demostramos que el 51% de los pacientes sin tratamiento tiene aumento de receptor soluble de Interleuquina 6 (IL-6sR) en plasma. El objeto de este estudio fue medir el IL-6sR intraplaquetario (6 pacientes sin tratamiento y 7 normales) y los niveles plasmáticos antes y durante el tratamiento con anagrelide en 16 pacientes por técnica de ELISA. Se evaluó también la expresión del mRNA específico para el IL-6sR y el receptor anclado (IL-6R) relativo a la expresión de  $\beta 2$ microglobulina ( $\beta 2M$ ) en células mononucleares totales por RT-PCR (8 pacientes sin tratar y 4 normales). Los niveles intraplaquetarios de los pacientes  $493 \text{ pg}/10^9 \text{ plaq}$  ( $235-1056$ ) (mediana y rango) y del grupo normal,  $758 \text{ pg}/10^9 \text{ plaq}$  ( $619-1069$ ) no difirieron, ni tampoco los niveles de IL-6sR plasmático pre y bajo tratamiento:  $43.8 \text{ ng/ml}$  ( $30-53$ ) y  $42.1 \text{ ng/ml}$  ( $25.8-50.9$ ). Se encontró una tendencia al aumento en los niveles de expresión de IL-6sR relativo a  $\beta 2M$  (pacientes 0.42, normales 0.29,  $p=0.054$ ). En síntesis se observa una tendencia al aumento de la expresión del IL-6sR en la TE y el anagrelide no la modifica.

19. **Niveles plasmáticos e intraplaquetarios de factores de crecimiento en Trombocitemia esencial.** Paola Lev, Rosana Marta, Silvia Barredo, Felisa Molinas.

*Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, UBA*

La Trombocitemia esencial (TE) es una enfermedad mieloproliferativa clonal. Estudiamos factores de crecimiento involucrados en la proliferación megacariocítica en 9 pacientes con diagnóstico de TE según criterios ya establecidos y 9 controles normales. Se utilizó plasma pobre citratado y plaquetas lavadas con buffer Hanks conservadas a  $-80^\circ\text{C}$ . Se dosó el factor de crecimiento de transformación beta (TGF  $\beta$ ), el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), por método de ELISA (R&D). Los valores intraplaquetarios obtenidos en pacientes y normales fueron: bFGF:  $1.5 \text{ ng/ml}$  ( $0.5-2.4$ ) (mediana y rango) y  $0.34 \text{ ng/ml}$  ( $0.04-0.7$ ),  $p<0.001$ ; TGF $\beta$ :  $186 \text{ ng/ml}$  ( $118-442$ ) y  $185 \text{ ng/ml}$  ( $94.5-360$ ); PDGF:  $58.7 \text{ ng/ml}$  ( $2-105$ ) y  $170 \text{ ng/ml}$  ( $70-275$ ),  $p<0.01$ . Los valores plasmáticos fueron: bFGF:  $5.72 \text{ pg/ml}$  ( $1-15.9$ ) y  $1 \text{ pg/ml}$  ( $1-2.6$ ),  $p=0.004$ ; TGF $\beta$ :  $1738 \text{ pg/ml}$  ( $996-2232$ ) y  $608 \text{ pg/ml}$  ( $271-857$ ),  $p<0.001$ ; PDGF:  $4339 \text{ pg/ml}$  ( $272-6413$ ) y  $1795 \text{ pg/ml}$  ( $612.7-3189$ ),  $p=0.02$ . En conclusión, el incremento de bFGF y TGF $\beta$  intraplaquetarios revelaría un aumento de la producción de estos factores. Los niveles elevados en plasma podrían deberse a liberación plaquetaria.

20. **Oxido nítrico, disfunción endotelial y activación plaquetaria en pacientes diabéticos tipo II.** Noemí Zanaro, Susana Ouviaña, R. La Greca, Beatriz Sasseti

*Dpto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Buenos Aires Buenos Aires, Argentina*

Las complicaciones vasculares y la disfunción endotelial son eventos frecuentes en pacientes diabéticos tipo II (DMNID). Nuestro objetivo fue tratar de correlacionar óxido nítrico (NO), glucemia (G), insulíemia (I), hemoglobina glicosilada ( $\text{HbA}_{1c}$ ), factor von Willebrand (vWF-Ag) y activación plaquetaria. Se estudiaron 16 pacientes DMNID (edad:  $62.2 \pm 10.5$  años) con macroangiopatía e hipertensión moderada (JNCV) y 15 controles sanos comparables (C). Se determinaron los niveles plasmáticos de vWF-Ag, P-selectina soluble (s-Psel) e I por ELISA, NO sérico mediante el reactivo de Griess y  $\text{HbA}_{1c}$  por MEIA y activación plaquetaria por la expresión de CD62P y CD63, utilizando citometría de flujo. Los resultados incrementados significativamente respecto de C ( $p<0.01$ ) fueron ( $X \pm \text{DS}$ ): NO:  $68.7 \pm 27.8 \mu\text{M}$  ( $43.5 \pm 20.2$ ), vWF-Ag:  $200 \pm 40 \text{ U/dL}$  ( $100 \pm 50$ ),  $\text{HbA}_{1c}$ :  $11.2 \pm 3.1\%$  ( $<8\%$ ), G:  $11.7 \pm 5.1 \text{ mmol/L}$  ( $4.9 \pm 1.2$ ), I:  $12.1 \pm 8.0 \text{ UI/mL}$  ( $10 \pm 7$ ), CD62P:  $45 \pm 5\%$  ( $<5\%$ ), CD63:  $20 \pm 5\%$  ( $<5\%$ ), s-Psel:  $48.9 \pm 21.6 \text{ ng/mL}$  ( $29 \pm 11$ ). Hallamos una correlación directa entre NO, G,  $\text{HbA}_{1c}$ , CD62P y vWF-Ag ( $p<0.01$ ) e inversa con I ( $p<0.05$ ). En conclusión: los niveles elevados de NO, debidos a la probable activación de la NO sintetasa inducible, no fueron eficaces para prevenir la activación plaquetaria.

21. **Acción del óxido nítrico (NO) sobre la producción de megacariocitos (Mks).** M. Schattner, A. Gorostizaga, M. G. Collado, R. Pozner, C. Fondevila, M.A. Lazzari

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

Se evaluó el efecto de diferentes dadores de NO: nitroprusiato de sodio (SNIP) e hidroxinitrososulhidrazono (DETA) sobre la proliferación de Mks inducida por trombopoyetina. Se utilizaron células mononucleares (CM) de médula ósea humana y citometría de flujo para la identificación de los Mks. El cultivo de CM en presencia de DETA a 0, 60, 125, 250 y 500 mM mostró una disminución en el

número absoluto de Mks ( $X \pm 103 \pm ES$ ) ( $328 \pm 68$ ,  $366 \pm 99$ ,  $234 \pm 102$ ,  $80 \pm 31$  y  $42 \pm 18$  respectivamente,  $n=4$ ). Esta disminución se asoció tanto a una menor cantidad total de células como a una menor frecuencia de Mks (%CD41a+). El tratamiento de las CM con SNIP también disminuyó el número absoluto de Mks ( $X \pm 103$ ,  $n=2$ ) ( $316$ ,  $252$ ,  $218$ ,  $165$  y  $215$ ) pero esta disminución fue asociada a una menor frecuencia de Mks y no a una alteración en la proliferación celular. Estas diferencias entre ambos dadores de NO podrían ser debidas a un requerimiento de concentraciones más altas de SNIP cuya vida media es menor que la del DETA. El perfil FSC citofluorométrico también mostró una disminución significativa en el tamaño de los Mks. Los resultados sugieren una regulación negativa del NO en la megacariocitopoyesis.

## 22. Rol de la glicoproteína Ib (gpIb) en la interacción plaquetas PMN. N Maugeri, M A Lazzari

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

Los PMN presentan sobre su superficie factor von Willebrand (vWf), el cual actúa como puente para el contacto con plaquetas. Nos propusimos evidenciar la participación de la GPIb utilizando un sistema de plaquetas y PMN lavados, incubados a  $37^\circ C$ , sin estímulo y sometidos a un shear rate equivalente a  $250 s^{-1}$ . La formación de agregados de plaquetas y PMN (APP) fue evaluada por citometría de flujo a doble color donde se determinó la presencia de plaquetas (CD42) en la región de PMN CD45 positivos. Los resultados (media  $\pm$  SEM) fueron: a) La formación de APP es nula en ausencia de agitación, b) Los APP se producen con células suspendidas en EDTA ( $18 \pm 2$  vs  $13 \pm 4\%$  de AM,  $n=5$ ) y c) El bloqueo de la GPIb con un MoAb (clon SZ1), inhibe la formación de APP ( $16 \pm 3$  vs  $7 \pm 2\%$  de AM,  $p < 0.001$ ,  $n=5$ ). Los resultados demuestran que las plaquetas utilizan la GPIb para unirse al vWf presente en la superficie leucocitaria durante la formación de agregados mixtos.

## ENDOCRINOLOGIA I NEUROENDOCRINOLOGIA

### 23. Efecto de la dieta apteica sobre la liberación hipotalámica de aminoácidos excitatorios e inhibitorios y GnRH. O. Ponzio, S. Nacht, D. Rondina, B. Szwarcfarb, S. Carbone, J. Moguilevsky, P. Scacchi

*Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA*

Se estudió la liberación hipotalámica basal e inducida por ClK 56 mM, de aminoácidos excitatorios e inhibitorios (pmol/mg tejido fresco) y de GnRH (pg/ml), en ratas macho alimentadas durante 21 días con dieta apteica. Los aminoácidos: glutamato (Glu), GABA, glicina (Gly) y taurina (Tau), fueron determinados mediante HPLC con detector UV. El GnRH se determinó por RIA. La liberación basal no es diferente entre el grupo apteico (Ap  $n=8$ ) y control (Co  $n=8$ ), para Glu (Co:  $6,25 \pm 1,1$  vs Ap:  $8,2 \pm 1,1$ ), GABA (Co:  $6,25 \pm 1,1$  vs Ap:  $6,18 \pm 1,31$ ), Gly (Co:  $9,67 \pm 0,51$  Ap:  $7,69 \pm 0,95$ ) y Tau (Co:  $4,15 \pm 0,39$  vs Ap:  $3,486 \pm 0,586$ ). El ClK 56 mM estimula significativamente ( $P < 0,05$ ) la liberación de todos los aminoácidos en ambos grupos; observándose sólo para el GABA una mayor liberación inducida ( $p < 0,025$ ) en los animales del grupo Ap (Co:  $10,7 \pm 1,26$  vs Ap:  $15,28 \pm 1,3$ ). La liberación basal de GnRH no es diferente en ambos grupos, sin embargo el ClK56 mM produce una mayor ( $P < 0,05$ ) secreción en el grupo Ap (Co:  $0,74 \pm 0,097$  vs Ap:  $1,708 \pm 0,41$ ). La dieta apteica no altera la secreción basal de aminoácidos hipotalámicos y de GnRH, aunque produce una mayor liberación inducida de GABA y GnRH.

### 24. Papel de los neuropéptidos hipotalámicos en el desarrollo de apetito salino e hipertensión por desoxicorticosterona (DOCA). Claudia Grillo, G.G. Piroli, Mónica Ferrini, Flavia Saravia, Paulina Roig, A.F. De Nicola

*Laboratorio de Bioquímica Neuroendocrina, Instituto de Biología y Medicina Experimental y Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA*

En el desarrollo de apetito salino por DOCA se encuentran involucrados neuropéptidos estimulantes como vasopresina (VP) y angiotensina, e inhibitorios como oxitocina (OT) y galanina. Anteriormente demostramos que la DOCA, en dosis que estimulan la natriorexigénesis, incrementa la expresión del ARNm de VP ya en un estadio prehipertensivo y este aumento se mantiene cuando el animal ha desarrollado hipertensión. El objetivo del presente trabajo fue estudiar por hibridización in situ la regulación del ARNm de OT que se co-sintetiza con VP en los núcleos hipotalámicos paraventricular (PVN) y supraóptico (SON). Se utilizaron ratas macho que se colocaron en jaulas individuales con libre acceso a agua y solución de NaCl al 3% (modelo de doble preferencia), y fueron divididas en 3 grupos: a) controles (CONT), tratadas con 10mg DOCA/animal/día en días alternados, 4 inyecciones en total (DOCA4i) y tratadas con DOCA en un total de 9 inyecciones (DOCA9i). Sólo los animales del grupo DOCA9i fueron hipertensos. No se observaron diferencias significativas en la expresión del ARNm de OT tanto en PVN como en SON. En otra serie de experimentos las ratas CONT o DOCA4i recibieron agua o NaCl al 3% como única opción. Los animales que bebieron la solución de sodio aumentaron el número de granos/célula en PVN (CONT-agua:  $244 \pm 11$ , CONT-sal:  $441 \pm 28$ ,  $p < 0.01$ ; DOCA-agua:  $251 \pm 32$ , DOCA-sal:  $424 \pm 45$ ,  $p < 0.01$ ). Estos incrementos en el mensajero de OT se correlacionan con una disminución en la ingesta de Na Cl al 3%. Los resultados sugieren que la OT no está involucrada en el desarrollo de apetito salino por DOCA en nuestro modelo de doble preferencia, pero sí estaría relacionada con la inhibición de la ingesta de sodio en el modelo de única opción. (Apoyado por PEI 191/97, PIP 4103, UBA-MT 013).

### 25. Polimorfismo de FSH en la pubertad masculina: efecto del GnRH. Silvina Creus, Silvia Gottlieb, C. Bergadá, Eliana Pellizzari, Selva Cigorraga, Stella Campo

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

Hemos descrito que durante la pubertad del varón se modifica el polimorfismo de la FSH circulante. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de una dosis única de GnRH sobre los análogos de carga aislados por isoelectroenfoque preparativo y sobre el perfil de distribución de isoformas determinado en cromatografía en Concanavalina-A en pubertad temprana (PT, 25µg), media (PM, 50µg) y avanzada (PA, 50µg). El GnRH provocó la desaparición de análogos de carga más ácidos y la aparición de análogos más básicos, PT ( $n=6$ ): rango pl: 3.5-5.5 vs 3.0-5.0; PM ( $n=6$ ): 4.0-6.0 vs 3.5-5.5; PA ( $n=4$ ): 3.5-5.0 vs 3.0-4.5; (GnRH vs basal). El GnRH modificó la distribución de las isoformas de FSH de acuerdo a la estructura interna de la cadena carbohidratada únicamente en PT; se observó un aumento de la proporción de isoformas con cadenas de oligosacáridos de tipo triantenario y bisectado (41% vs 17%) disminuyendo la proporción de isoformas con cadenas biantenarias y truncadas (23% vs 44%). La bioactividad no mostró diferencias. Estos resultados muestran que el GnRH libera isoformas de FSH con menor contenido en ácido siálico; su acción sobre la estructura interna de los carbohidratos unidos al polipéptido observada selectivamente durante la PT sugiere que este efecto está regulado por el entorno hormonal.

### 26. Efectos de la malnutrición sobre la respuesta inmuno-neuroendocrina. Andrea Chisari, L. Corró, A. Giovambattista, E. Spinedi

*Unidad de Neuroendocrinología, IMBICE, La Plata*

El objetivo de este estudio fue el determinar la influencia de la restricción alimentaria (RA, 7-8 g diarios), en la rata hembra Sprague-Dawley, sobre la respuesta inmuno-neuroendocrina a las 2 hs post-endotoxina (LPS, 180 mg/Kg) cuando estudiadas a los 60 días de edad. Los resultados indicaron que, respecto a niveles basales (2 hs post-vehículo), la RA no modificó significativamente los de ACTH ( $26 \pm 6$  pg/ml) y TNF ( $1,02 \pm 0,12$  ng/ml) vs. los respectivos en el grupo control (CTR, alimentadas *ad-libitum*;

ACTH:  $14,8 \pm 1,3$  y TNF:  $0,99 \pm 0,13$ ); sin embargo, el grupo RA mostró los niveles de corticosterona (B;  $36,1 \pm 11,3$  mg/dl) y leptina (LEP;  $1,06 \pm 0,22$  ng/ml) significativamente ( $p < 0,05$ ) mayores y menores, respectivamente, que los hallados en el grupo CTR (B:  $5,15 \pm 0,71$  y LEP:  $3,65 \pm 1,01$ ). El tratamiento con LPS: a) aumentó los niveles de ACTH en CTR ( $530 \pm 65$  pg/ml) en forma significativamente ( $p < 0,05$ ) mayor que en RA ( $185 \pm 47$ ); b) indujo niveles circulantes de B semejantes entre grupos (CTR:  $71 \pm 9$  y RA:  $63 \pm 5$ ); c) incrementó los niveles de TNF en CTR ( $2,97 \pm 0,33$  ng/ml) en forma significativamente ( $p < 0,05$ ) mayor que en RA ( $1,5 \pm 0,1$ ) y d) no modificó los niveles basales de LEP en ningún grupo. Estos resultados indican que la severa RA disminuyó las respuestas de los sistemas neuroendocrino e inmune al LPS.

**27. Efecto de agonistas ionotrópicos del glutamato sobre la liberación de prolactina en cultivos de células adenohipofisarias.** M. Pampillo, S. Theas, B. Duvilanski, A. Seilicovich, M. Lasaga

*Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, UBA*

Con el fin de investigar si agonistas ionotrópicos del glutamato ejercen un efecto directo en la adenohipofisis, se investigaron sus efectos sobre la liberación de prolactina (PRL) desde células adenohipofisarias de ratas hembras y machos, que fueron cultivadas durante 72 hs e incubadas durante 4 hs con las sustancias en estudio. El NMDA (100 mM) aumentó en forma significativa la secreción de PRL en ratas hembras y machos. Este efecto fue bloqueado por antagonistas específicos de los receptores tipo NMDA (Hembras: Control:  $225,50 \pm 10,88$  ng PRL/well; NMDA:  $539,18 \pm 36,02$ ; NMDA+DAP-5 10 mM:  $270,35 \pm 18,23$ ,  $p < 0,01$ ,  $n=4-6$ ; Machos: Control:  $243,67 \pm 12,59$ ; NMDA:  $367,71 \pm 23,27$ ; NMDA+MK-801 10 mM:  $287,53 \pm 24,87$ ,  $p < 0,01$ ,  $n=4-5$ ). El cocultivo de células adenohipofisarias con células del lóbulo neurointermedio aumentó la secreción de PRL y en estas condiciones no se observó el efecto estimulador del NMDA (Control AH:  $243,67 \pm 12,59$ ; AH+NMDA:  $367,71 \pm 23,27$ ; Control AH+LNI:  $412,48 \pm 14,58$ ; AH+LNI+NMDA:  $429,72 \pm 8,70$ ;  $p < 0,01$ ,  $n=4-5$ ). El kainato (KA) (100 mM) estimuló la liberación de PRL en ratas hembras. Este efecto no fue bloqueado por DNQX, antagonista del receptor tipo KA (Control:  $91,23 \pm 9,08$ ; KA:  $319,30 \pm 30,58$ ; KA+DNQX 10 mM:  $351,20 \pm 16,89$ ,  $p < 0,01$ ,  $n=5-6$ ). En ratas machos, el KA no afectó la liberación de PRL. En conclusión, el NMDA estimularía la liberación de PRL en ratas de ambos sexos. El KA podría estar actuando a través de receptores híbridos, similar NMDA, ya que el efecto estimulador del KA no es bloqueado por DNQX en las ratas hembras.

**28. Efectos *in vitro* de la Endotoxina Bacteriana sobre la Liberación de Gonadotropinas, GnRH y GABA durante el Desarrollo Sexual en Ratas macho.** C Feleder, P Arias, D Refojo, Silvina Moguilevsky

*Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA*

Los procesos infecciosos pueden afectar el desarrollo sexual, por un mecanismo ligado a la activación del sistema inmunológico central. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del LPS (endotoxina bacteriana, activadora del sistema inmune) sobre fragmentos hipotalámicos e hipofisarios de ratas macho de 30 (inmaduras) y 60 días (adultas) de edad; se determinó la liberación de LH, FSH, GnRH (medidas por RIA), y de GABA (medida por HPLC-UV), uno de los neurotransmisores involucrados en el control del desarrollo puberal. Tanto en los animales inmaduros como en los adultos, el LPS inhibió significativamente ( $p < 0,02$  y  $p < 0,05$ , respectivamente) la liberación de GnRH; al mismo tiempo estimuló la liberación de GABA. Estos efectos fueron más marcados en los animales inmaduros ( $p < 0,05$ ) que en los adultos. Únicamente en los animales inmaduros el LPS inhibió significativamente ( $p < 0,05$ ) la liberación de LH y FSH. En conclusión, la inhibición ejercida por el LPS sobre el eje reproductor es más marcada en la etapa peripuberal, afectando tanto al nivel hipotalámico como al nivel hipofisario.

**TUMORES I**  
**ANGIOGENESIS Y DISEMINACION TUMORAL**

**29. Elastosis estromal y metastasis en ganglios linfáticos axilares en carcinomas de mama.** L. Wernicke, L. Piñeyro, M Telenta

*Hospital Italiano, Buenos Aires*

La elastosis estromal (ES) del carcinoma de mama se ha asociado a buen pronóstico. Investigamos la presencia ES en el estroma de carcinomas mamarios cuantificándola en tres grados (leve, moderada y franca) y estudiamos su correlación con la presencia de metástasis en ganglios linfáticos axilares. Se evaluaron cortes histológicos de rutina en 806 casos consecutivos subdivididos por tamaño: T1b ( $n=112$  casos): 59 con elastosis leve, de los cuales 15 (24%) presentaron axila positiva (AP), 30 con ES moderada: 1 caso (3,3%) con AP y 23 con ES franca, 1 caso con AP (4,3%) (Fisher  $p < 0,006$ ). En los T1c ( $n=357$ ) y en los T2 ( $n=337$ ) no hubo correlación entre ES y AP. Se tomaron 366 casos con AP ( $n$  total=806) evaluándose la presencia de ES en relación al número de ganglios positivos: 307 casos con ES leve o moderada presentaron una media de 2 ganglios positivos y 59 con ES franca mostraron una media de 1 ganglio positivo ( $p < 0,01$  Mann Withney). Se realizó además un análisis de múltiples variables histológicas por test de regresión logística en 682 casos con datos completos (del  $n$  total = 806). La elastosis se asoció positivamente con la presencia de bordes infiltrativos ( $p < 0,000$ ), a la desmoplasia ( $p < 0,0000$ ) y edad postmenopáusica ( $p < 0,01$ ) y negativamente al tipo tumoral ( $p < 0,0000$ ) y al número de metástasis axilares ( $p < 0,02$ ). No se halló asociación entre elastosis y presencia de axila positiva. Conclusion: La elastosis podría ser un indicador de enlentecimiento del proceso invasivo y de la generación de metástasis axilares.

**30. Generación de angiostatina por células cancerosas y resistencia antitumoral concomitante.** M. Mercedes Binda, Alejandro D. González, Alejandra L. Boquete, R. Daniel Bonfil

*Fundación de Investigación del Cáncer, CEFYBO, Buenos Aires*

Previamente se ha demostrado que la inhibición de tumores secundarios en huéspedes en los que existe un tumor previo (resistencia antitumoral concomitante o RC) se debería a un fenómeno antiangiogénico. Utilizando las líneas de cáncer de pulmón humanas Calu-6 y H460, y la de mama murina M3MC hemos analizado la RC en ratones nude y BALB/c, respectivamente. Se verificó una reducción del volumen tumoral secundario respecto del control de 80% (Calu-6), -2% (H-460) y 83% (M3MC), 24 días después de inocular las células tumorales en segunda instancia en grupos de 4 a 6 ratones. Los medios condicionados *in vitro* por esas mismas líneas se coincubaron por 24 hrs con plasminógeno y, luego, la expresión de angiostatina (PM@38 kD) se analizó por Western Blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti-kringles 1-3 del plasminógeno. Mientras que las líneas inductoras de RC generaron angiostatina a partir del plasminógeno, la línea H460 fue incapaz de hacerlo. En base a los resultados se destaca el probable rol de la angiostatina en la RC. (Investigación subsidiada por la Fundación Alberto J. Roemmers)

**31. Los cambios mixoides estromales tienen un valor pronóstico por posible intervención en el proceso metastático del cáncer de mama. Parte I.** M Wernicke, Laura Piñeyro, Daniela Caramuti, Vanesa Dorn

*Hospital Italiano, Buenos Aires*

Los cambios mixoides (CM) observados en el estroma de los carcinomas de mama tienen entre sus componentes al ácido hialurónico, mucopolisacárido que se asocia a la capacidad metastásica de los carcinomas. Se estudiaron los CM en 1053

carcinomas de mama, la evaluación fue semicuantitativa a doble ciego en cortes teñidos con Hematoxilina-eosina e inmunomarcación con la b-PG for Hyaluronan (proteoglicano que colorea ácido hialurónico). Se realizó conteo de focos de CM con los siguientes resultados: < 2 focos= débiles, 2 a 4 focos = moderados y > 4 focos = francos. La serie se subdividió en dos grupos de pacientes con los siguientes resultados:

a) 753 casos consecutivos sin estudio pronóstico : 279 con CM débiles y 81 con axila positiva (AP) (27%), 239 con CM moderados y 111 con AP (46%) y 235 con CM francos y 155 con AP (66%) (x=81.5, Fisher: p<0.00000). En el estudio de regresión logística los CM se asocian positivamente a AP (p<0.000000), al margen tumoral (p<0.000000), a las embolizaciones linfáticas (p<0.00008) y negativamente a la desmoplasia (p<0.009) y a la edad (p<0.02). b) 300 casos estudio pronóstico y axila negativa (AN) con seguimiento de 10 años: 195 con CM débiles y 7 muertes (3.5%) contra 105 con CM francos y 10 muertes (9.5%) (Log Rank: p<0.02). **Conclusión:** Los estudios realizados nos permiten concluir que los cambios mixoides del estroma tumoral en el carcinoma de mama se asocian:1) muy significativamente a la presencia de metástasis en ganglios axilares y 2) débilmente a la sobrevida de los pacientes.

**32. Regulación de la angiogénesis y progresión tumoral por óxido nítrico (NO).** Lilia Davel, Ana Eiján, H. Rueda, María A. Jasnís

*Instituto de Oncología A.H.Roffo, Facultad de Medicina, UBA*

El NO puede tener un efecto estimulador o inhibitorio en el desarrollo tumoral. Nuestro objetivo fue estudiar la modulación por NO de la angiogénesis y progresión de un adenocarcinoma mamario murino (S13). Ratones BALB/c se inocularon con células S13 en flanco o en la almohadilla plantar y se trataron con 1g/l de L-Arg (A) o de L-NAME (N), vía oral, durante toda la evolución tumoral (20-25 días). Se evaluó el crecimiento del tumor, la incidencia y el número de metástasis pulmonares. El tratamiento con N disminuyó significativamente el tamaño tumoral (flanco: 22,54 ± 2,91 vs 17,43 ± 2,04 mm; p<0,01 y pata: 1,81 ± 0,2 vs 1,65 ± 0,08 mm; p<0,05; Control vs N), la incidencia y el número de metástasis. En los ratones portadores, los ganglios drenantes (axilar y poplíteo) aumentaron de tamaño, producto de una histiocitosis sin evidencia de metástasis y el N redujo significativamente su tamaño; cuando éstas células se coinocularon con células S13 (100:1) inhibieron el crecimiento del tumor comparado con células de ganglio de portadores tratados con A: 2,20 ± 0,25 vs 2,71 ± 0,51 mm; p<0,05. El tratamiento con N de ratones normales receptores de células S13, bloqueó la respuesta angiogénica (p<0,01). Concluimos que NO facilitaría el crecimiento del tumor S13, ya que el tratamiento prolongado con un inhibidor de la síntesis de NO disminuye la progresión tumoral, asociada a una disminución de la angiogénesis y a una mayor actividad citotóxica de las células ganglionares.

**33. Efecto del tratamiento combinado con un bloqueante de canales de Ca<sup>2+</sup> y el inhibidor sintético del uPA B428 sobre la motilidad in vitro y la capacidad metastásica del carcinoma F3II.** EF Farías, Laura Todaro, Virginia Ladedá, Elisa Bal de Kier Joffé

*Instituto de Oncología Ángel H. Roffo, Facultad de Medicina, UBA*

Se demostró que la sobreexpresión de uroquinasa (uPA) en células tumorales es regulada por vías Ca<sup>2+</sup>-dependientes y que el bloqueo del ingreso de Ca<sup>2+</sup> extracelular por el verapamilo (V) inhibe la capacidad invasiva y metastásica. La inhibición catalítica del uPA mediante el B428 (B) reduce la invasividad tumoral local pero no la capacidad metastásica. Se evalúa aquí si la combinación de V y B aumenta su efecto antimetastásico. Se observó inhibición de la migración de las células F3II con V 50µM (47.7%), B 15µM (43.1%) y V 25µM/B 7.5µM (50%) respecto del control. También se redujo el nº de células en spreading (nº cél/campo):

C: 45±7.8; V: 35±9.5\*; B: 37±7.2\*; V/B: 31±8.6\* (\*p<0.01). La actividad uPA (UI/mg prot.) fue menor (\*p<0.001): C: 2±0.6; V: 1.19±0.08\*; B: 0.29±0.02\*; V/B: 0.37±0.09\*. Sólo el tratamiento combinado [V (171µg/ratón/día)/B (500µg/ratón/día)] de ratones inoculados sc o iv con células F3II disminuyó la incidencia (C 100%; V/B 60%) y el nº de metástasis espontáneas (Md (rango): C: 9 (2-18); V/B: 3 (0-13)\* (\*p<0.05)) y experimentales (C: 37.5 (2-224); V/B: 4.5 (0-210)\* (\*p<0.01)) respecto del control. La combinación de dos drogas con diferente mecanismo de acción antiapoptótico no aumentó la inhibición de V o B in vitro, en las dosis utilizadas, pero mejoró el efecto antimetastásico in vivo.

**34. Inhibición de metástasis pulmonares de un tumor por transferencia de suero de ratones portadores de otro tumor.** PD di Gianni, OD Bustuoadad, M Franco, G Dran, RA Ruggiero

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

Demostramos que ratones BALB/c portadores de un tumor primario LB inhibían el desarrollo de un segundo tumor. El carcinoma C7HI no generaba esta inhibición pero su desarrollo metastásico era inhibido por la presencia del tumor LB. Demostramos que la capacidad de inhibir un tumor secundario estaba asociada a factores séricos de bajo peso molecular (MW) que inhibían in vitro la proliferación tumoral. En este trabajo estudiamos el efecto de estos factores séricos in vivo. Para ello, ratones portadores de un tumor s.c. C7HI de 55 días recibieron diariamente durante 14 días un inóculo e.v. de: a) suero LB (n=6), b) fracción de bajo peso molecular (1000D) del suero LB (n=5) c) fracción de alto MW del suero LB (n=6), d) suero normal (n=5) y e) nada (n=8). Macroscópicamente, el número de metástasis pulmonares fue (media y rango): a) 62.2 [6-145] (p<0.05), b) 59.6 [26-95] p<0.05; c) 123.8 [44-208], d) 136.0 [33-277] y e) 103.1 [31-218] (test U de Mann Whitney). Resultados similares fueron obtenidos en el conteo de metástasis microscópicas, donde la inhibición estuvo asociada a una disminución en el número de células en mitosis y a la inducción de apoptosis. Los resultados demuestran que es posible transferir actividad antimetastásica por inoculación de suero LB y fracciones de suero LB de bajo peso molecular (pero no por la fracción de alto peso molecular) y que actuaría a través de un mecanismo antiproliferativo y de muerte celular.

**FISIOPATOLOGIA PULMONAR**

**35. Relación entre el movimiento paradójico del abdomen (pAB) y movimiento paradójico de diafragma (Pga -) durante resistencias inspiratorias.** A. Suarez, F. Pessolano, AJ. Roncoroni, EL De Vito

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

La pAB es un signo clínico utilizado para evaluar en forma no invasiva el movimiento paradójico del diafragma, sin embargo su grado de coincidencia no ha sido sistemáticamente evaluado. **Objetivo:** Establecer en que medida la pAB se asocia a Pga -, durante cargas inspiratorias fatigantes y no fatigantes. **Material y métodos:** 4 sujetos normales (28-38 años). Variables: Presión gástrica (Pga) y movimiento tóraco-abdominal (TX+AB= SUMA, pleitismografía de inductancia, RIP). Carga inspiratoria resistiva no fatigante NF (Índice de Tensión Tiempo del diafragma -TTdi <0.14) y fatigante F. TTdi >0.14. pAB: toda deflexión negativa en presencia de SUMA positiva; movimiento paradójico del diafragma: Pga negativa durante la inspiración. **Resultados:**

Carga	NF	F	p
Ttdi	0.082 ± 0.03	0.162 ± 0.02	0.01
% pAB	56.3% ± 33.1	53.1% ± 37.5	NS
Pga- con pAB	76.1%	85.3%	0.001

**Conclusiones:** Ambas cargas produjeron similar porcentaje de pAB. Durante carga F la pAB refleja en mayor grado la presencia de paradoja diafragmática.

**36. Relaciones entre variabilidad del flujo pico espiratorio (FPE) y reactividad bronquial medida por histamina.**  
Vanessa Longobardi, Silvia Quadrelli, DM Pinna, JP Suárez, AJ Roncoroni

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

La variabilidad del FPE ( $\Delta$ FPE) es considerada una evidencia indirecta de hiperreactividad bronquial (HRB) y utilizada en ocasiones como sustituto de la medición de la PC20. Fueron estudiados 20 pacientes con medición de FPE cada 4 hs durante 10 días y test de histamina. No hubo correlación entre  $\Delta$ FPE (mejor PEF-peor PEF/mejor PEF  $\times$  100) y PC20 ( $r=0.25$ ).  $\Delta$ FPE  $>$  20% vs  $<$ 20% no discriminó pacientes con mayor severidad de enfermedad. En cambio PC20  $<$  2 mg/mL vs  $>$  2mg/mL identificó pacientes más severos por mayor requerimiento de esteroides sistémicos (32.2 $\pm$ 35.1 vs 1.8 $\pm$ 2.23 días/año  $p=0.04$ ) o inhalados (295 $\pm$ 140.2 vs 112.1 $\pm$ 140.6 días/año  $p=0.01$ , dosis media 1190 $\pm$ 580 vs 585 $\pm$ 401 mcg/d  $p=0.04$ ), mayor número de días sintomáticos (247.5 $\pm$ 128.5 vs 71.4 $\pm$ 58.9 d/año  $p=0.006$ ) mayor número de reagudizaciones en el último año (4.1 $\pm$ 2.8 vs 0.8 $\pm$ 1.12  $p=0.01$ ) y peor VEF1 (64.4 $\pm$ 13.4 vs 95 $\pm$ 12.2 % del pred  $p=0.002$ ). Se concluye que la variabilidad del FPE no puede sustituir la de la HRB.

**37. Comparación de distintos cuestionarios de evaluación de disnea (CD).** C Glize, Silvia Quadrelli, Mariana Grinberg, EM Sobrino, R Rabinovich, AJ Roncoroni

*Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, UBA*

Con el objetivo de evaluar la comparabilidad de los CD se estudiaron 14 pacientes con Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) a los que se aplicaron 4 CD diferentes: escala de Fletcher (F), test de Mahler (con 3 ítems magnitud de tarea-MT-, magnitud de esfuerzo-ME- y magnitud de deterioro funcional-MDF-), Medical Research Council (MRC) y New York Heart Association (NYHA) en 2 oportunidades. La reproducibilidad de los mismos fue equivalente (F 2.84 $\pm$ 1.09 vs 2.66 $\pm$ 1.17, MDF: 2.07 $\pm$ 1.54 vs 2.36 $\pm$ 1.22, MT: 1.69 $\pm$ 0.72 vs 1.83 $\pm$ 0.89, ME: 2 $\pm$ 0.87 vs 1.75 $\pm$ 0.82, MRC 1.69 $\pm$ 0.99 vs 1.91 $\pm$ 1.38, NYHA 2.07 $\pm$ 0.61 vs 2.25 $\pm$ 0.82,  $p=NS$ ) y sus coeficientes de variación no fueron diferentes (F 16.4 $\pm$ 23.1%, MDF: 16.2 $\pm$ 19.2%, MT: 20 $\pm$ 26.7, ME: 17.2 $\pm$ 19.2, MRC 16.4 $\pm$ 22.7, NYHA 5.6 $\pm$ 10.7, ANOVA  $p=NS$ ). Los coeficientes de correlación de los CD vs el Borg final, los metros caminados en el test de 6 min (m), la P<sub>lmax</sub>, el VEF1 y el PEF fueron comparables. Las únicas diferencias se obtuvieron en la correlación con los m, la mejor correlación se obtuvo con MT ( $r=0.88$ ) y con el MRC ( $r=0.76$ ). La utilización de distintos CD es equivalente. La facilidad del MRC y su valor predictivo de metros caminados los hacen altamente recomendables.

**38. Percepción de la obstrucción bronquial en condiciones agudas y subagudas.** DM Pinna, Silvia Quadrelli, Vanesa Longobardi, JP Suárez, AJ Roncoroni

*Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, UBA*

La adaptación temporal es uno de los factores postulados como modificadores de la percepción de la obstrucción bronquial (POB). Para comparar la POB en función del tiempo fueron estudiados 20 pacientes con medición dos veces al día de FPE y score de síntomas (SS) durante 3-4 semanas y 1 prueba de histamina con determinación de Borg. La correlación entre caída del VEF durante histamina ( $\Delta$ VEF1H) fue mayor (media  $r$  0.62  $\pm$ 0.35) que la de SS y la caída del PEF (media  $r$  SS diurnos vs PEF diurno 0.24 $\pm$ 0.22, media  $r$  SS diurnos vs PEF nocturno 0.30 $\pm$ 0.20). En

11.1% la  $r$  de FPE vs SS fue  $>$  0.6 mientras que en 78.5%  $\Delta$ VEF1H vs Borg fue  $>$  0.6. Todos los pacientes tuvieron algún episodio de caída del PEF  $>$  del 20% no sentido (SS = 0) y sólo 44% tuvieron caídas del  $\Delta$ VEF1H  $>$ 20% con Borg 0. Se registraron 48 episodios de caída del FPE  $>$  20%, 67% no fueron percibidos (SS=0) y 33 episodios de  $\Delta$ VEF1H  $>$ 20% de los cuales sólo 33% no fueron percibidos (Borg=0). No hubo correlación entre  $r$  FPE vs SS y  $\Delta$ VEF1H vs Borg (SS diurnos  $r=0.19$ , SS nocturnos 0.2). Los pacientes perciben menos la obstrucción bronquial que sucede en el curso de horas comparada a la desarrollada en minutos.

**39. Función pulmonar en pacientes con enfermedad de Duchenne.** EM Sobrino, R Rabinovich, E De Vito

*Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, UBA*

Fueron estudiados 40 pacientes con enfermedad de Duchenne bajo tratamiento con esteroides (deflazacort 19.4 $\pm$ 6.3 mg/d). Los mismos se agruparon por edad: Grupo I (6-11 años,  $n=15$  media 8.7 $\pm$ 2.4 años), Grupo II (11-14 años,  $n=11$  media 11.8 $\pm$ 3.7 años) y Grupo 3 (15-17 años,  $n=14$ , media 16.1 $\pm$ 4.6 años). Se verificó disminución de la capacidad vital en función de la edad (CVF: Grupo I 97.6 $\pm$ 27.1, Grupo II 107.8 $\pm$ 62.9, Grupo III 55.5 $\pm$ 26.6 ANOVA  $p=0.002$ ) con mantenimiento del patrón restrictivo (VEF1/FVC 85.4 $\pm$ 29.1, Grupo II 87.1 $\pm$ 27.7, Grupo III 82.0 $\pm$ 24.5,  $p=NS$ ). La capacidad de difusión se mantuvo normal (DLCO Grupo I 93.3 $\pm$ 37.9%, Grupo II 90.3 $\pm$ 32.1%, Grupo III 81.5  $\pm$  30.0%  $p=NS$ , DLCO/VA Grupo I 93.0 $\pm$ 27.7%, Grupo II 85.7 $\pm$ 30.6%, Grupo III 115.9 $\pm$ 35.7%,  $p=NS$ ). Los pacientes con enfermedad de Duchenne presentan incapacidad ventilatoria restrictiva progresiva con conservación de la capacidad de difusión.

**40. Caminata de 6 minutos (6mWT) en pacientes con Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).** Silvia Quadrelli, EM Sobrino, R Rabinovich, C Glize, Mariana Grinberg, AJ Roncoroni

*Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, UBA*

Fueron evaluados 14 pacientes con EPOC (edad 62,6 $\pm$ 5,7, VEF1 1.20 $\pm$ 0.45 L, PaO<sub>2</sub> 80,4 $\pm$ 8.3mmHg, PaCO<sub>2</sub> 39.0 $\pm$ 3.2 mmHg, Pimax -62.3 $\pm$ 21.7 cmH<sub>2</sub>O). La limitación para determinar los metros caminados (m) en el 6mWT (media 510.7  $\pm$ 89.9 m) no fue por disnea (Borg basal vs m:  $r=0.1$ , Borg final vs m,  $r=0.06$ ). Tampoco hubo relación con el VEF1 basal ( $r=0.5$ ), el PEF ( $r=0.05$ ) o la SaO<sub>2</sub> basal ( $r=0.51$ ). Los pacientes con mayor deterioro de la Pimax tuvieron menor capacidad de ejercicio ( $r$  Pimax vs m caminados = 0.88). El incremento del Borg fue 5.07  $\pm$  1.4 y no correlacionó con los m, el VEF o la Pimax. La caída de la SaO<sub>2</sub> fue 3.3  $\pm$  3.6%. La SaO<sub>2</sub> final fue menor en los pacientes con menor PaO<sub>2</sub> basal ( $r=0.60$ ) y menor VEF1 ( $r=0.69$ ). En 3 pacientes (21%) la SaO<sub>2</sub> cayó a menos de 90%. Ninguna variable fue diferente a la de los pacientes que no desaturaron. La tolerancia al ejercicio está determinada por otras variables adicionales al grado de obstrucción bronquial. No puede predecirse qué pacientes desaturarán durante el ejercicio. La 6mWT es necesaria para evaluar pacientes con EPOC.

## NEUROCIENCIAS I

**41. El medio ambiente afecta la expresión de la astrogliá inmunoreactiva en la corteza cerebral de la rata.** SJ Lipina, SB Gayol, J Paz, J López Camelo, JA Colombo

*Unidad de Neurobiología Aplicada (CEMIC-CONICET), Buenos Aires*

El enriquecimiento o la deprivación ambientales tempranas modifican al sistema nervioso central tanto estructural como funcionalmente. Se evaluaron los efectos de aquellas variables sobre la astrogliá de la corteza cerebral en dos grupos de ratas:

A (n=4), estimulación sensorial, motriz y social durante dos meses; B (n=4), privación de las condiciones del grupo A. Los cerebros fueron procesados para la inmunomarcación de la proteína glio fibrilar (GFAP-IR) (a-GFAP, Biogenex, 1:5.000). Se tomaron muestras de la región frontal áreas 1 y 2 (n=1534) (Zilles, 1985) a tres distancias desde el polo frontal (1, 3 y 5 mm) y se midió la expresión de GFAP-IR en láminas I a VI por medio de un sistema automatizado de análisis de imágenes (Optimas). Los datos fueron transformados trigonométricamente y analizados con el test de análisis múltiple de varianza. Se observó: a) en el grupo A la GFAP-IR tuvo una mayor expresión que en el grupo B ( $p < 0.0001$ ,  $F = 366.65$ ); b) diferencias entre ambos grupos con respecto a hemisferios ( $p = 0.02$ ,  $F = 5.855$ ), segmentos ( $p < 0.0001$ ,  $F = 16.160$ ) y láminas ( $p = 0.02$ ,  $F = 3.244$ ); c) una mayor expresión de la GFAP-IR en las láminas I y VI del grupo A. Estos resultados indican que: a) las variables ambientales utilizadas afectaron en forma diferencial la astrogliosis de la corteza cerebral de los grupos estudiados, observándose una mayor expresión de la GFAP-IR en el grupo sometido a enriquecimiento; b) esta variación carece de simetría interhemisférica y homogeneidad citoarquitectónica (laminar). Agradecimientos: Fund. Conectar, Fund. Bco. Boston, CONICET, CEMIC.

#### 42. Alteraciones morfológicas de Astrocitos en cerebros de ratas hipertensas portales. J Perazzo, Olga Canessa, Mónica Ferrini, Alejandra M Franchino, Laura Bengochea, Carolina Ghanem, F. Eizayaga, Camila Scorticati, A. Lemberg

*Cátedra de Fisiopatología e Histología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA*

En la Hipertensión portal experimental hay alteraciones en el metabolismo de catecolaminas a nivel sistema nervioso central. En la encefalopatía hepática, se han descrito alteraciones en los astrocitos. Para estudiar la existencia de alteraciones morfológicas de los mismos se usaron 15 ratas Wistar macho. 5 hipertensas portales-Grupo I- (por estrechez reglada de la vena porta), 5 ratas simil operadas -Grupo II y 5 ratas controles -Grupo III. Al día 14 se sacrificaron, extrayéndoles el cerebro. Se realizó una reacción inmunohistoquímica para la detección de la proteína glio fibrilar ácida (GFAP) utilizando un anticuerpo policlonal anti-GFAP en los cortes cerebrales eligiéndose la zona del hipocampo como centro de estudio. Se observó que en el Grupo I existe hipertrofia del cuerpo celular y procesos citoplasmáticos como también un aumento en la inmunoreactividad de GFAP al compararlos con los grupos II y III. *Conclusiones:* se vio en este modelo experimental modificaciones en el sistema astrocítico, que sugiere posibles alteraciones en sus funciones de intercambio iones-agua y/o de neurotransmisión.

#### 43. Modulación de la astrocitosis reactiva post-lesional. A. Yañez, V. Puissant, A. Meter, J.A. Colombo

*Unidad de Neurobiología Aplicada, CEMIC-CONICET, Buenos Aires*

La modulación de la gliosis reactiva es deseable en cualquier estrategia destinada a optimizar el proceso de reorganización del sistema nervioso. A fin de determinar la dependencia de aquella de fenómenos celulares inmediatos a la lesión, y su posible modulación, se comparó el efecto sobre la astrocitosis de cuatro medios inoculados en una lesión cortico-estriada realizada bajo control estereotáxico. Ratas adultas en 5 grupos de 6 animales cada uno: A) control intacto, B) PBS (solución salina bufferada), C) DMEM (medio basal de cultivo), D) FGF (Factor de Crecimiento Fibroblástico) 400ng/ml y E) antiFGF p/sat 400ng/ml, fueron inoculadas con un gel reabsorbible embebido en cada medio. Los animales se sacrificaron a los 28 días. Los cerebros se procesaron para inmunohistoquímica de GFAP (Proteína Glio fibrilar Ácida). El área relativa ocupada por GFAP-IR se cuantificó en forma semiautomática en cortes coronales de una zona de 200um paralela al borde de la lesión. Los valores, normalizados, fueron comparados por ANOVA o Kruskal-Wallis. La superficie relativa

de GFAP-IR mostró la siguiente progresión en los grupos analizados: intactas < FGF < DMEM < antiFGF < PBS. Las diferencias observadas (con respecto al DMEM) tuvieron los siguientes valores de  $p$ :  $< 0.001$ ,  $< 0.05$ , ns,  $< 0.001$  respectivamente. El FGF y el DMEM modificaron significativamente los valores de GFAP-IR con respecto al PBS. El FGF redujo en un 18% dicho valor respecto del DMEM ( $p < 0.05$ ). Estos resultados indican que las horas inmediatamente posteriores a una lesión del neuropilo central son críticas para determinar el grado de astrocitosis reactiva ulterior. Agradecimientos: CORPOMEDICA, FUNDACION CONECTAR.

#### 44. Regionalización de la respuesta astrocitaria a la injuria neuronal por virus Herpes Simplex-tipo 1 (HSV-1). R. L. Caccuri, R. F. Iacono, María I. Berría

*Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, UBA*

El objetivo fue la discriminación en niveles topográficos de la reacción astrocitaria a la inoculación de HSV-1 por vías intracerebral o intraperitoneal en ratones lactantes. A los días 2, 5, 10 y 15, se cosecharon encéfalos y médulas espinales para la marcación por inmunoperoxidasa de antígeno viral y de proteína glio fibrilar ácida. El conteo de células GFAP-positivas se realizó mediante adaptación al microscopio óptico de una grilla de 0.01 mm<sup>2</sup> de sección, y esos datos trasladados a scattergramas. Se observaron diferencias estadísticamente significativas no sólo en la aparición de astrocitosis, previsiblemente iniciada en estructuras vecinas al sitio de inoculación, sino en la intensidad de la activación exhibida por diferentes áreas de SNC, ya que fue acentuada y progresiva en corteza temporal, hipocampo, cerebelo y estructuras subcorticales troncodiencefálicas, siendo moderada en cortezas frontal y parietal, y menor aún en corteza occipital. En consecuencia, se destaca el carácter regional de una astrocitosis dependiente del subtipo celular involucrado.

#### 45. Evaluación de la memoria episódica en pacientes con demencia tipo Alzheimer (DTA) y deterioro de memoria asociado a la edad (DMAE). P. Harris<sup>1</sup>, M. Drake<sup>2</sup>, R.F. Allegri<sup>1,2</sup>

*Servicio de Investigación y Rehabilitación Neurológica, CEMIC<sup>1</sup> y Servicio de Neurología, Hospital Británico<sup>2</sup>, Buenos Aires*

*Objetivos:* 1) evaluar la memoria episódica (aprendizaje de una lista de palabras) en pacientes con DTA y en sujetos con DMAE; 2) establecer un índice de olvido (IO) que refleje los resultados del aprendizaje, y 3) analizar la sensibilidad y especificidad del IO para el diagnóstico diferencial de las poblaciones estudiadas. *Pacientes y métodos:* fueron seleccionados de nuestra base de datos 91 sujetos (68.1 ± 3.4 años; F/M 66/25) con DMAE, y 79 pacientes (70.3 ± 3.1 años; F/M 53/26, MMSE > 19) con DTA, que consultaron entre marzo de 1995 y marzo de 1998. Los pacientes con DTA fueron clasificados de acuerdo al MMSE (Folstein, 1975) en DTA-1: >24; DTA-2: 22-24; DTA-3: 21-19; los sujetos con DMAE fueron divididos en relación al puntaje obtenido en la prueba de aprendizaje serial (DMAE-1: < 1DS; DMAE-2: 1 a 2 DS; DMAE-3: > 2 DS, del promedio de adultos jóvenes). La memoria episódica fue evaluada a través del aprendizaje de una lista de palabras (tres ensayos) (BEM 144; Signoret, 1979). El IO expresa la relación entre el número de palabras recordadas después de una interferencia y la mayor cantidad de palabras aprendidas en los tres intentos. *Resultados:* los pacientes con DTA difieren significativamente (ANOVA) de los DMAE-1 y DMAE-2 tanto en capacidad de aprendizaje como en la progresión del mismo. El IO fue significativamente mayor en los tres grupos de pacientes con DTA, en comparación a los pacientes con DMAE. *Conclusión:* del presente trabajo surge la importancia del índice de olvido como parámetro de gran sensibilidad y especificidad para el diagnóstico diferencial de pacientes con DTA y DMAE.

#### 46. Potenciales Evocados Somatosensitivos en la Esclerosis Múltiple Infantil y Juvenil. MJ Segura, S Tenenbaum, C Medina

*Servicio de Neurofisiología, Hospital de Pediatría J. P. Garrahan, Buenos Aires*

**Objetivos:** Comparar el perfil de anomalías de los Potenciales Evocados Somatosensitivos (PESS) en pacientes con Esclerosis Múltiple Infantil (EMI) y Juvenil (EMJ). **Métodos:** En 8 pacientes con EMI y 6 con EMJ se promediaron y reduplicaron 200 respuestas de los PESS parietales (Cz'-Fz) evocados por estímulo del nervio Tibial Posterior empleando filtros de 3000 a 25 Hz y un tiempo de análisis de 100 ms. **Resultados:** El grupo con EMI mostró respuestas de amplitud disminuida y significativamente inferior a la de pacientes con EMJ (EMI:  $0.97 \pm 0.56$  uV; n:13 miembros vs EMJ:  $2.42 \pm 1.22$  uV; n:10 miembros) ( $p < 0.05$ ). Por el contrario, las latencias corregidas por edad y estatura mostraron valores más enlentecidos en pacientes con EMJ que en aquellos con EMI, aunque sin alcanzar una diferencia significativa. **Conclusiones:** Estos resultados sugieren que la afectación de la vía somatosensitiva en ambas entidades produce un perfil de anomalías electro-fisiológicas distintivas a semejanza de las descriptas en parámetros neuroradiológicos y neuroinmunológicos.

## INMUNOLOGIA I INMUNOLOGIA BASICA

### 47. Estudio funcional de linfocitos intraepiteliales intestinales (LIE) TCR $\gamma/\delta$ + y TCR $\alpha/\beta$ + de ratas inmunodeficientes. MG Márquez, A Galeano\*, ME Roux.

*\*Laboratorio Patológico del Sanatorio Mater Dei; Laboratorio de Inmunología Celular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA*

Se ha demostrado que LIE CD8+ intervienen en el mecanismo de inhibición de la reacción de hipersensibilidad retardada (RHSR) contra el antígeno dextrina de la dieta pero no hacia el leván. **Objetivo:** investigar si los LIE TCR $\gamma/\delta$ + y/o  $\alpha/\beta$ + participan en esta inhibición. Se aislaron LIE TCR $\gamma/\delta$ + y  $\alpha/\beta$ + -por gradiente de Percoll y separación magnética- de ratas Wistar que al destete recibieron dieta libre de proteínas que contiene dextrina y a continuación caseína 20% durante 21 días (R21). LIE totales aislados de ratas controles de igual edad (C) así como LIE $\gamma/\delta$ + o  $\alpha/\beta$ + de R21 fueron transferidos iv en ratas C (C-C ó R21 $\gamma/\delta$ -C ó R21 $\alpha/\beta$ -C, respectivamente). Se estudió el fenotipo de los LIE por citometría de flujo. **Resultados:** 1) RHSR: (X $\pm$ ES) C-C vs R21 $\gamma/\delta$ -C:  $0.64 \pm 0.15$  vs  $0.08 \pm 0.01$ ,  $p < 0.02$ ; C-C vs R21 $\alpha/\beta$ -C: pNS. 2) Citometría de flujo: R21 vs C (X $\pm$ ES) LIE CD8 $\alpha/\alpha$ + :  $54.6 \pm 7.2\%$  vs  $26.2 \pm 2.3\%$ ,  $p < 0.05$  y co-expresión de TCR $\gamma/\delta$   $22.7 \pm 4.8\%$  vs  $6.57 \pm 0.4\%$ ,  $p < 0.04$  y LIE CD8 $\alpha/\beta$ + no co-expresan el TCR $\gamma/\delta$ . **Conclusión:** los LIE TCR $\gamma/\delta$ +CD8 $\alpha/\alpha$ + intervienen en el mecanismo de inhibición de la RHSR contra el antígeno-T-independiente dextrina. (PICT 0273 y PIP 4147)

### 48. Antígenos (Ag) de ciatostomas equinos detectados por sueros de equinos infectados naturalmente y de conejos inmunizados con sus extractos. MG, Soba, M Stella, F Raffa, A Ríos Centeno, P Maure, M Braun

*Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires*

Los ciatostomas equinos son parásitos digestivos de la familia *Strongilidae* que, pese a que son poco patógenos, generalmente pueden provocar una grave enfermedad en el caballo. Existen más de 50 especies de ciatostomas cuya identificación difícil y tediosa, y no se si algunas especies son más patógenas que otras. Hemos estudiado un haras local, en el cual ocurrieron numerosas muertes por ciatostomas, donde hay una gran preponderancia de la especie *Cylicocyclus insigne*. Nuestro objetivo es conocer la respuesta inmune de animales infectados naturalmente, para conocer y prevenir mejor la enfermedad. A tal fin se prepararon extractos somáticos solubles poliespecíficos de vermes adultos de todas las especies que parasitan el haras y mono-específico

de *C. insigne*, que fueron estudiados por PAGE e inmunoblot frente a suero de equinos de ese haras y conejos inmunizados con extractos parasitarios. Por PAGE, apareció en todos los homogenatos una banda de  $\approx 30$  kD, no reactiva con ningún suero. Por inmunoblot, con suero equino, las bandas reactivas más importantes aparecieron entre 90 y 40 kD, donde se encontraron bandas distintas entre los extractos poli y mono específicos. Con suero de conejos, apareció una banda fuerte de  $\approx 50$  kD, que no apareció con sueros equinos. Estos resultados proponen que podría desarrollarse una técnica para la determinación de especie con sueros mono-específicos.

### 49. Uso de genes variables kappa en anticuerpos de porcinos. C. Perez, J. Galeota\*, D. Wylie\*, O. Lopez

*Facultad de Ciencias Veterinarias. UBA; \*Universidad de Nebraska, USA*

Los genes  $V_H$  del porcino pertenecen a una pequeña familia de genes muy relacionados entre sí, homólogos a la familia  $V_H III$  humana. Se sabe que los porcinos expresan genes kappa y lambda en sus anticuerpos, pero no existen datos sobre las secuencias y el uso de familias de genes variables para las cadenas livianas en esta especie. Aquí reportamos secuencias de transcritos de cadenas variables livianas porcinas obtenidas de transcritos provenientes del bazo de un cerdo adulto usando RACE-PCR. A partir de estas dos secuencias identificamos dos familias de genes  $V_L$  kappa porcinas, homólogas a las familias I y II humanas. El nivel de identidad entre los transcritos  $V_L$  kappa porcinos y los genes  $V_L$  kappa humanos es mayor al 80%. También encontramos el uso de, al menos, dos genes  $J_K$  en estos transcritos. Los mismos presentan un alto grado de homología con los genes  $J_K V$  de ratón y  $J_K I$  de humano, sin embargo, los genes  $J_K$  del porcino codificarían para un aminoácido más que las dos especies antes mencionadas. El modelado molecular teórico de las proteínas derivadas a partir de las secuencias obtenidas indica que los transcritos de  $V_L$  kappa porcinos y sus homólogos humanos son similares en cuanto a su conformación espacial.

### 50. Caracterización de genes $V_H$ de anticuerpos bovinos. A. Pereda, C. Perez, F. Scigliano, D. Wylie\* y O. Lopez

*Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA; \*Universidad de Nebraska, USA*

Los genes  $V_H$  de inmunoglobulinas bovinas de cadena pesada expresados, pertenecen a una familia de genes muy relacionados homólogos a la familia Q52 murina. Llamamos a esta familia BovH1 (Berens, et al, 1997. Int. Immunol. 9:189). Nuestro grupo y otros han obtenido secuencias de genes  $V_H$  por PCR a partir de DNA genómico bovino, cuya identidad entre sí es mayor al 85%. Los mecanismos con los que el bovino genera diversidad en sus anticuerpos son poco claros y el estudio de los genes  $V_H$  ayudará a solucionar este problema. Para ello, hemos clonado tres genes  $V_H$  completos a partir de una biblioteca de bacteriófago lambda construida a partir de DNA genómico bovino. Estos genes son idénticos en un 90% entre sí en la región codificante del gen  $V_H$ . El espaciador tiene un largo diferente e incluye secuencias regulatorias como las encontradas en otras especies. Las señales de recombinación son idénticas y se observa una alta identidad en los 200 pb localizados 5' del inicio de la transcripción. Dos de estos genes pertenecen a la serie que hemos denominado Ra, que codifica para una glutamina en el primer aminoácido del  $V_H$ . El otro pertenece a la serie que llamamos Lu, y codifica para una lisina en el primer codón del  $V_H$ . Se discute el impacto de estos datos en la generación de diversidad de los anticuerpos bovinos.

### 51. Células T TCR $\gamma/\delta$ y $\alpha/\beta$ en el tejido linfóide asociado a bronquios (BALT) de ratas Wistar inmunodeficientes por déficit proteico severo al destete. M.G. Márquez, G.A. Sosa, N. Slobodianik\*, M.E. Roux

*Laboratorio Inmunología Celular y \*Cátedra de Nutrición, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA*

Células T TCR $\gamma/\delta$ + aparecen en ciertos tejidos fetales y en BALT -que se desarrolla a los 4 días pospartum- las hemos detectado a los 7 días de edad aumentando numéricamente hasta los 45 días para luego disminuir. El objetivo actual fue determinar el número de células T TCR $\gamma/\delta$  y  $\alpha/\beta$  en la lámina propia del BALT de ratas inmunodeficientes. Cortes seriados en parafina del tracto respiratorio bajo (pulmones) se estudiaron por inmunohistoquímica, detectándose el número de células T  $\gamma/\delta$ + y  $\alpha/\beta$ + en 15 campos en: 1) ratas que al destete recibieron dieta libre de proteínas (LP, 39 días), 2) ratas LP que recibieron caseína 20% durante 21 días (R21, 60 días) y 3) controles de igual edad (C39 y C60). Resultados: X $\pm$ ES, n=5, en LP vs C39 vs C60 vs R21, g/d: 48.6 $\pm$ 2.4 vs 118.0 $\pm$ 21.4 vs 121.2 $\pm$ 4.0 vs 172.2 $\pm$ 13.1, p<0.01 y a/b: 48.6 $\pm$ 4.1 vs 77.5 $\pm$ 10.4 vs 164.8 $\pm$ 11.4 vs 127.4 $\pm$ 10.3, p<0.05 (Tukey-Kramer). Conclusiones: 1) las células  $\gamma/\delta$ + y  $\alpha/\beta$ + están muy disminuidas en LP y 2) las células  $\alpha/\beta$ + disminuidas y las  $\gamma/\delta$ + aumentadas en R21 respecto del control (C60) indican un deterioro en la diferenciación y/o maduración del TCR. (PICT 0273 y PIP 4147)

**52. Reconocimiento de la fracción activa de la heparina por la subunidad C1q del complemento a baja fuerza iónica.**  
G. Calabrese, G. Licciardi, F. Leocata Nieto, E.F. Recondo\*, M.E.F. de Recondo

*Facultad de Farmacia y Bioquímica y \*Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires*

La heparina exhibe un amplio rango de actividades biológicas, entre las cuales se destacan su actividad anticoagulante y la inhibición de la activación del complemento. *Objetivo:* establecer si las actividades anticoagulante y anti-complementaria residen en el mismo sitio de la molécula de heparina. Se han estudiado las condiciones en que el glicosaminoglicano interacciona con el complejo proteico C1q. Se utilizó heparina de alto peso molecular de una actividad anticoagulante de 179.3 U/mg. El C1q se aisló de plasma sanguíneo humano y se purificó por cromatografía en columna de Biogel A5m. La interacción entre estas dos moléculas se evaluó leyendo la turbidez desarrollada a 420 nm después de 1 hora de incubación a 37°C, pH 7, [Ca<sup>2+</sup>] 2 mM, fuerza iónica 25 mM y relación heparina/C1q 2. En estas condiciones se logró separar, en el precipitado de la interacción, una fracción de heparina con una actividad anticoagulante específica de 1140  $\pm$  111.2 U/mg (p<0.001 vs heparina total; n=7), que contenía el 15.07 % de la cantidad original de heparina medida por el método de R. Montelongo. Estos resultados indicarían que las dos actividades de la heparina mencionadas se encuentran en el mismo sitio de la molécula. El aislamiento de una fracción de heparina con elevada actividad anticoagulante, mediante un método relativamente sencillo y reproducible, podría tener implicancias para su aplicación clínica en el tratamiento de enfermedades en las cuales está involucrada la activación del sistema del complemento.

## CARDIOVASCULAR I GENETICA CARDIOVASCULAR

**53. Variantes de la apolipoproteína E (apo E) en población adulta con y sin hipertensión arterial esencial (HTA).**  
Fabiana Leonardi, Silvia I García, Patricia I Porto, T Kirsznner, J Lajfer, Y Plotquin, C González, CJ Pirola

*Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, UBA y Servicio de Hipertensión, Hospital Zubizarreta, Buenos Aires.*

El locus de la apo E sería determinante de los niveles de lípidos plasmáticos y del riesgo relativo de aterosclerosis. El objetivo del presente estudio fué analizar la asociación de los alelos  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 y  $\epsilon$ 4 (PCR y RFLP con HhaI) con las características clínicas de 29 individuos normales (edad: 54 $\pm$ 1.5 años) y 98 hipertensos (edad: 58.8 $\pm$ 0.8 años). Ambos grupos difieren

(Spearman, p<0.05) en el BMI (25.3 $\pm$ 0.4 vs 27.1 $\pm$ 0.4), masa ventricular izq. (93.6 $\pm$ 3.5 vs 135.5 $\pm$ 4.8), glucemia (92.1 $\pm$ 6.3 vs 93.8 $\pm$ 1.5), insulinemia (15.7 $\pm$ 2.0 vs 12.7 $\pm$ 1.9 y aldosterona sérica (161.4 $\pm$ 25.2 vs 107.0  $\pm$ 7.3) pero no en los lípidos, actividad renínica o angiotensinógeno plasmáticos. La frecuencia (%) de cada genotipo en ambos grupos no difirió y en la población total fué de  $\epsilon$ 2/ $\epsilon$ 2: 0.8,  $\epsilon$ 2/ $\epsilon$ 3: 8.7,  $\epsilon$ 3/ $\epsilon$ 3: 70.1,  $\epsilon$ 3/ $\epsilon$ 4: 20.5,  $\epsilon$ 4/ $\epsilon$ 4: 0, similares a las observadas en otras poblaciones blancas. No observamos asociación entre estos genotipos y la historia familiar de HTA y/o enfermedad coronaria aunque la dosis del alelo  $\epsilon$ 4 correlacionó con la glucemia (Spearman, R:0.21, p<0.02). En síntesis, en esta población no hemos hallado asociación entre los genotipos de la apo E y lípidos séricos y/o historia familiar de eventos coronarios.

**54. Miocardiopatía Dilatada Alcohólica (MDA): ausencia de macrófagos en presencia de apoptosis.** Juan Picena<sup>1</sup>, H. Balbarrey, S. Sarancone, E. Guibert<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Patología, Facultad Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario <sup>2</sup>Biología Molecular, Facultad Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas Universidad Nacional de Rosario

En la insuficiencia cardíaca (I.C.) por MDA el deterioro progresivo de la función miocárdica podría atribuirse en parte a la presencia de apoptosis. Los macrófagos intervendrían en la eliminación de restos celulares. En muestras de miocardio de pacientes (p.) fallecidos hace 30 años en el Hospital del Centenario, con I.C. por MDA, detectamos fragmentación nuclear (apoptosis) y decidimos investigar la presencia de macrófagos. De 14 p. masculinos con I.C. con clasificación funcional NYHA  $\chi$ =3,28, fallecieron 6. Se obtuvieron necropsias de 5 p. (edad media=39 $\pm$ 2 años). En cortes de tacos de parafina se realizó la detección in situ de apoptosis (TUNEL y DAPI), y la búsqueda de macrófagos (H/E y marcación con CD68). Los controles fueron 3 p. fallecidos hace 30 años, sin patología miocárdica. Se hallaron cuerpos apoptóticos y ausencia de macrófagos, confirmados por reacciones específicas para detectar el ADN fracturado y la negatividad del marcador CD68. Conclusión: la apoptosis sería inducida como respuesta celular a la agresión. La ausencia de macrófagos indicaría que estamos en un estadio nuclear de la apoptosis.

**55. Ploidía y actividad PCNA de los núcleos en oruga ("caterpillar") de los cardiocitos fetales humanos.** H. García Rivello, A. Gallo, P. Cabeza Meckert, R.P. Laguens, L. Palacios

*Cátedra Patología B, UNLP, Anatomía Patológica Universidad Favaloro y Hospital Italiano, Buenos Aires*

Un hallazgo típico del miocardio fetal es la presencia de miocitos con núcleos en oruga ("caterpillar") con condensación longitudinal de la cromatina. La presencia en el miocardio inmaduro sugiere una relación con los procesos de hiperplasia cardíaca. Se evaluaron 10 corazones fetales (17 a 23 semanas) mediante estudios histológicos con HE y Feulgen para estudios de ploidía nuclear. Se evaluó la expresión de la proteína PCNA por inmunohistoquímica. La histología mostró proporciones variables de núcleos en oruga (3,5 a 67/1000 miocitos). Valores de ploidía de cardiocitos: 2c=89,9% ( $\pm$ 6.02), 4c=8,6% ( $\pm$ 4.9) y >4c=1,4% ( $\pm$ 1.7). Ploidía de núcleos caterpillar: 2c=7.3% ( $\pm$ 8.7); 4c=46.3% ( $\pm$ 24) y >4c=46.6% ( $\pm$ 26.3). El 13,4 % ( $\pm$ 7,3) de los cardiocitos expresaron PCNA contra 30,68% de los núcleos caterpillar ( $\pm$ 11,7). En este estudio se observó que los núcleos caterpillar presentan valores de ploidía nuclear y expresión de PCNA elevados, indicando su relación con la actividad replicativa del ADN.

**56. Transferencia de genes al endotelio, mediada a través de un vector baculoviral recombinante.** P. Argibay, L. Tesson, P. Moullier, I. Anegón

*Hospital Italiano, Buenos Aires e INSERM U437, Nantes, Francia*

El endotelio puede ser blanco de la terapia génica en diversas áreas como el trasplante de órganos, enfermedades vasculares y sepsis. Los baculovirus (Bv), estudiados principalmente como vectores hacia células hepáticas, ofrecen como ventajas, la no-expresión de genes virales en la célula transfectada y la capacidad de transportar transgenes de gran tamaño. El objetivo del trabajo fue utilizar un Bv recombinante para el gen de la  $\beta$ -galactosidasa, bajo control del promotor de CMV. Se transfectaron segmentos de aorta porcina y de rata y líneas de células endoteliales humanas(H), porcinas(P) y de rata(R). Los controles negativos no mostraron actividad de  $\beta$ -galactosidasa a través del revelado con X-Gal. En los tejidos los Bv mostraron un patrón difuso de expresión, similar al control positivo adenovirus/ $\beta$ gal (Av), aunque menos intenso. Sobre líneas celulares la expresión media sobre 500 células contadas fue la siguiente: H= Av (70 $\pm$ 10), Bv(55 $\pm$ 10)  $p < 0.05$ . P= Av (400 $\pm$ 20), Bv(325 $\pm$ 18)  $p < 0.05$ . R=Av(120 $\pm$ 13), Bv(50 $\pm$ 8)  $p < 0.05$ . Concluimos que los baculovirus pueden ser utilizados como vectores de transferencia génica hacia el endotelio.

57. **Fenotipos linfocitarios en aneurismas aórticos.** A. M. Camino, R. P. Laquens

*Cátedra de Patología, Universidad Favaloro, Buenos Aires*

**Objetivos:** estudiar las poblaciones celulares y su distribución en los infiltrados inflamatorios en aneurismas aórticos abdominales ateroscleróticos humanos para indagar la posible participación de mecanismos inmunes en su desarrollo. **Métodos:** se determinaron los fenotipos de células B, CD4, CD8, NK, y células plasmáticas (método de inmunoperoxidasa empleando anticuerpos monoclonales específicos) en 10 resecciones quirúrgicas de aneurismas aórticos. **Resultados:** en todos los casos se observaron infiltrados mononucleares (media $\pm$ SD: 2.7 $\pm$ 2.8%, rango: 0.05-8.9) de localización adventicial e intraparietal. La población celular B (6.2 $\pm$ 7.3%, 0-19) presentó una localización exclusivamente adventicial, al igual que las células plasmáticas (0.5 $\pm$ 1.7%, 0-5.5). Las células CD8 (9.6 $\pm$ 17%, 0-52.3) se observaron predominantemente a nivel intraparietal, al igual que las células NK (5.2 $\pm$ 6%, 0-18.8). **Conclusiones:** la diferente ubicación topográfica de las células inmunológicamente competentes (linfocitos B adventiciales, y CD8 intraparietales) sugiere la participación de distintos mecanismos efectores (inmunidad humoral y celular) en el proceso aterosclerótico de la aorta abdominal.

58. **Asociación de alelos de los genes de la enzima de conversión (ECA), angiotensinógeno (Ao), y receptor tipo 1 de la angiotensina (AT1R) y la presión arterial (PA) por monitoreo ambulatorio (MAPA) en adolescentes.** PI. Porto, R Simsolo, SI García, B. Grunfeld, AL. Alvarez, CJ Pirola

*FEHYLIN, Hospital de Niños R Gutiérrez; Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, UBA*

Estudiamos la asociación de los alelos I/D del gen de la ECA, M235T y T174M del Ao y A1166C del AT1R (PCR-ASO-RFLP) con la hipertensión y PA (clínica y MAPA) en adolescentes (112 normotensos, edad: 11.6 $\pm$ 4.4 años y 43 hipertensos (HT), edad: 13.8 $\pm$ 3.3 años. La dosis de alelos D de la ECA correlacionó (Spearman, R: 0.70, n=39,  $p < 0.0005$ ) con la actividad enzimática sérica y su prevalencia no difirió entre ambos grupos. El alelo 235T del Ao fué más prevalente en los HT (R=0.23, n=98,  $p < 0.02$ ) y correlacionó con la PAS diurna y nocturna (R=0.36, n=48,  $p < 0.01$ ), y las presiones de pulso diurna, nocturna y de 24 hs (R=0.38, 0.34, y 0.41, n=48,  $p < 0.03$ ), independientemente de la edad, sexo o BMI. El alelo 174M del Ao fué más frecuente en los non-dippers (R=0.32, n=58,  $p < 0.02$ ) y correlacionó con el Z score de PAS y PAD clínicas (R=0.22 y 0.23, n=104,  $p < 0.03$  y  $p < 0.02$ ). Dada la frecuencia (%) de los genotipos del AT1R (AA: 48.3, AC: 45.7, CC: 6.0) el polimorfismo no fué suficientemente informativo. En adolescentes, ciertos alelos de estos genes se asociarían a una mayor PA en forma independiente de la edad, sexo y BMI.

## GASTROENTEROLOGIA I PANCREAS

59. **El método del "Pfeffer-temporario" o del "asa duodenal cerrada" (adc) de corto tiempo (20'), induce en la rata lesiones de pancreatitis aguda independientemente del reflujo duodeno-bilio-pancreatico, (r-dbp).** OM Tiscornia, S Hamamura, ES. de Lehmann; G Otero, H Waisman, P Tiscornia-Wasserman

*Programa de Estudios Pancreáticos y L.I.P, Hospital de Clínicas José de San Martín, UBA*

El modelo del ADC de corto tiempo (20min) sin reflujo bilio-pancreático mimetiza a la "pancreatitis-aguda-biliar". En ratas macho (n=26), bajo Tiopental, un cateter fue ubicado en el duodeno a través del antrogastrico. El ADC se replecionó con Taurocolato de Na 7% más azul de metileno. A los 20' se aspiró el contenido del ADC, 4 hs. más tarde los animales fueron exanguinados. Se determinó el peso húmedo de los todos órganos abdominales y torácicos. El grupo experimental mostró un aumento significativo ( $p < .001$ ) del peso pancreático y en sangre del recuento leucocitario, enzimas pancreáticas y transaminasas. La microscopía óptica reveló edema, necrosis acinar, focos hemorrágicos y citoesteatonecrosis en toda la glándula. Se postula que reflejos autonómicos activados desde el "gatillo" (duodeno-peri-vateriano) juegan un rol fisiopatogénico crucial.

60. **Modelo experimental de pancreatitis aguda en la zarigüeya (opossum) centrado en la distensión con balón del "gatillo" (duodeno-peri-vateriano) de la glándula pancreática.** OM Tiscornia, H García, J Affanni

*Programa de Estudios Pancreáticos y CIP Hospital de Clínicas Jose de San Martín, UBA*

El objetivo fue mimetizar la pancreatitis aguda biliar (PAB) humana. Se escogió al "opossum" por las similitudes de su árbol ductal bilio-pancreático con las del hombre. Bajo anestesia (Ketalar), se distendió el duodeno peri-vateriano (D-PV) con balón (10 ml) de una sonda Foley N #18, introducida desde el antrogastrico. Parámetros sanguíneos fueron evaluados pre y post distensión (PD) (4 h) del "gatillo" (D-PV) pancreático. El protocolo se efectuó en animales controles C (n=7) y en dos grupos experimentales sometidos 45 días antes sea a una vaguectomía troncular (VT) (n=7) o a una esplac. bil. (EB). En C los valores PD revelaron marcada leucocitosis y elevación significativa ( $p < 0.001$ ) de la amilaseemia, lipasemia, transaminasas y CPK. Estos fueron signif. atenuados en el "opossum" con VT y EB previa. Se concluye que la distensión del D-PV constituye un método simple para reducir a la PAB humana. Se postula que la "irritación" del "gatillo" pancreático desencadena arcos reflejos autonómicos (ARA): colinérgicos, adrenérgicos y del sistema nervioso autónomo aferente ("reflejos pseudoaxónicos"). La elevación de los valores de las transaminasas y de la CPK en C y su significativa atenuación por la VT y EB revelan que ARA también juegan un probable rol patogénico en hígado.

61. **Lipasa Pancreática (LP) y Triglicéridos (TG) plasmáticos en ratas con pancreatitis aguda (PA).** R Resnik, L Schreier, O Pozzo, D Rondina, P Scacchi, MA Cresta, R Wikinski

*Laboratorio Lípidos y Lipoproteínas, Facultad de Farmacia y Bioquímica; Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA*

La actividad triglicérido-hidrolasa de LP tendría un rol en la asociación entre hipertrigliceridemia (HTG) y PA. Nuestro fin es evaluar la correlación entre actividad de LP y cambios en TG plasmáticos y en composición de VLDL en ratas HTG por dieta rica en sacarosa (Control, n=8) y ratas con la misma dieta y PA por inyección ip. de 45  $\mu$ g ceruleína/kg (ratas PA, n=7). Para comprobar si LP degrada TG de VLDL de Control se midió TG-VLDL antes y después de la incubación con suero rico en LP obtenido de

ratas PA. En suero de ambos grupos se determinó LP, TG, se aisló VLDL y se determinaron sus componentes. Se obtuvo correlación inversa entre LP y TG-VLDL  $r=-0,59$ ,  $p>0,05$ . TG en ratas PA fue, media $\pm$ ES: 80,38  $\pm$ 11,3 mg% y TG-Control 123,77 $\pm$ 25,7 mg%. TG-VLDL disminuyó en ratas PA (80,9 $\pm$ 3,9 % vs 87,2 $\pm$ 1,4)  $p<0,05$ . La incubación de VLDL con suero de ratas PA demostró en todos los casos degradación de TG, mediana (rango) 60 % [12-130] VLDL de Control fue sustrato de LP y ratas HTG con PA presentaron disminución de TG-VLDL asociado a mayor actividad de LP.

**62. Niveles séricos de pregnancy zone protein (PZP) en pacientes con Pancreatitis aguda.** Danilo Ceschin, Lida Bissaro, Adrián Ramos, Miguel Vides, Gustavo Chiabrando

*Departamento Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba*

La PZP es una  $\alpha$ -macroglobulina humana inhibidora de proteinasas liberadas a la circulación en procesos inflamatorios con necrosis. El complejo PZP-proteinasa es depurado por el hígado a través de un mecanismo de endocitosis. La PZP presenta niveles séricos de hasta 10 mg/l en personas normales, aumentado hasta 300 mg/l al final del embarazo y en algunos procesos inflamatorios. El objetivo del presente trabajo, fue evaluar los niveles séricos de PZP en pacientes con pancreatitis aguda (PA). Todos los pacientes fueron diagnosticados a través de parámetros séricos bioquímicos y por diagnóstico de imágenes. La litiasis biliar fue el causante etiológico de todas las pancreatitis estudiadas, la cual presenta una alta incidencia sobre el sexo femenino. PZP sérica se midió por EIA, en mujeres ( $n=7$ ) con PA. Ésta se realizó en forma longitudinal desde la internación (día 1) hasta la resolución del caso (día 10 como máximo). En los días 1 y 2, la totalidad de los pacientes mostraron un incremento significativo de PZP 55 $\pm$ 25 mg/l con respecto a individuos normales ( $n=20$ ;  $p<0,001$ ; test de Mann-Whitney). A partir del día 3, se observó una disminución del valor medio a 38 $\pm$ 13 mg/l. Luego del sexto día, hubo un aumento hasta alcanzar un valor medio de 80 $\pm$ 41 mg/l. Concluimos que la disminución de PZP entre el tercer y sexto día sería producto de la interacción y depuración de las proteinasas liberadas durante la pancreatitis. Por lo tanto, PZP actuaría como un depurador de proteinasas, sumándose a la acción protectora de necrosis intra- y extra-pancreática de otros inhibidores tales como  $\alpha_1$ -antitripsina y  $\alpha_2$ -Macroglobulina.

**63. Sistema Nervioso Autónomo y estrés gástrico, en ratas.**

OM Laudanno, J Cesolari, I Geolito, P San Miguel, O Bedini  
*Gastroent. Experiencia Facultad Ciencias Méd. Rosario. U.N.R.*

Estudiar mecanismos agon. y antagón. adren., coliner., endorf., GABA y aminas vasoactivas, en la prevención de lesiones agudas gástricas en estrés (E). Ratas Wistar ( $n=10$  c/grupo), 200g, ayuno 24 hs: I. 1ml Fisiol. sc. II. E.T. por inmovilización e inmersión en agua 18°C 6 hs. III. Isoproterenol (I) 0.1-1mg/Kg sc, E. IV. Propanolol (P) 0.1-1mg/Kg sc, E. V. Prazosin (Pra) (ant  $\beta_1$  ad. post.sin) 0.1-1mg/Kg sc, E. VI. Acetilcolina (Ac) 0.1-1mg/Kg sc, E. VII. Atropina (At) 0.1-1mg/Kg sc, E. VIII. Tramadol (T) 0.1-1mg/Kg sc, E. IX. Naloxona (N) 0.01-0.1mg/Kg sc, E. X. Vigabatrin (V) (ag. GABA) 100-250mg/Kg sc, E. XI. Flumazenil (F) 0.1-1 mg/KG sc, E. Finalizado E., sobredosis éter, punc. card. sangre hepar.: Cortisol, Nor-Ad, Adren., Dopam., Seroton. y Melatonina; laparotomía, gastrectomía, se tabuló % área lesional macrosc. muc. gástrica e histol. (HE). *Resultados:* % área lesión gástr. dio: E.T. 78.9 $\pm$ 6.7; sólo I, Pra, T y V dieron protección 2-4% ( $p<0,001$ ); en cambio P, Ac, At, N y F 75-80% (NS). Las aminas T vs. ET sólo incrementó Nor-Ad. 1.18 $\pm$ 0.3 vs. 9.25 $\pm$  2.9 ( $p<0,01$ ) y Ad. 0.46 $\pm$ 0.09 vs 1.1 $\pm$ 0.5 ( $p<0,02$ ). Los diferentes ag. y antag. sólo V y F vs. E.T. incrementaron Melatonina: E.T. 121.4 $\pm$ 18.0, V 224 $\pm$ 19.5 ( $p<0,01$ ) y F 216 $\pm$ 24 ( $p<0,01$ ). En E. ag  $\beta$  ad, antag.  $\beta$  1 ad. post-sin, ag. Endorf. y GABA dieron protección gástrica, con similares aminas vasoactivas, except. Vigabatrin que incrementó Melatonina.

**64. Expresión de citoquinas por células acinares en la pancreatitis inducida por lipopolisacárido (LPS).** María I. Vaccaro, El Calvo, G Lanosa, D Sordelli, JL Iovanna

*Universidad de Buenos Aires, Universidad de Sherbrooke, Canadá; INSERM U315, Francia*

Diversas citoquinas podrían mediar la inducción de pancreatitis aguda. El objeto de este estudio fue establecer si el LPS induce la expresión de citoquinas en células acinares pancreáticas AR42J de rata. Se analizó mediante *Northern blot* los ARNm para TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-8 y para la proteína asociada a la pancreatitis (PAP). No se detectó expresión de ARNm para PAP ni para las citoquinas en células incubadas en ausencia de LPS. La presencia de LPS indujo expresión dosis-dependiente del ARNm para PAP, con un pico a 10  $\mu$ g/ml de LPS. El ARNm para PAP apareció a las 6 h (DO: 0.3333 $\pm$ 0.0003) y aumentó ( $p<0,01$ ;  $n=3$ ) después de las 18 h de incubación con LPS (DO: 1.8028 $\pm$ 0.0005). La exposición de las células a 10  $\mu$ g/ml de LPS indujo la expresión de ARNm para TNF- $\alpha$  a las 6 h (DO: 0.431 $\pm$ 0.003) con un máximo ( $p<0,01$ ;  $n=3$ ) a las 12 h (DO: 7.622 $\pm$ 0.005). La exposición al LPS también indujo la expresión de IL-1 $\beta$  y de IL-8, las que fueron máximas luego de 18 h de incubación. Se concluye que el LPS puede inducir la expresión de citoquinas en células acinares pancreáticas y que estaría implicado en la fisiopatología de la pancreatitis aguda por acción directa sobre dichas células.

## INFECTOLOGIA I VIRUS

**65. Infección por Virus de la Hepatitis C (VHC) post-trasplante renal.** Valeria Mas, Susana Albano, Teresita de Alvaleros, D Camps, C Giraud, Graciela de Boccardo

*Hospital Privado, Centro Médico de Córdoba*

Con el aumento en la sobrevida del trasplante renal (Tx-r) la enfermedad hepática es una importante causa de morbi-mortalidad en estos pacientes (ptes). Valoramos la evaluación pre-tx y la evolución a largo plazo de VHC post Tx-r. Se estudiaron 61 ptes en el pre-Tx con serología para VHC (ELISA). Post-Tx, los pacientes VHC(+) fueron testeados con RT-nested PCR (9-18 meses). En las muestras positivas se determinó carga viral (CV). Los pacientes Tx-r con VHC(-) fueron considerados grupo control negativo. Se valoraron transaminasas (ts) y biopsia hepática (bx-h) en ptes con elevación de las mismas. Se analizó n° de rechazos, sobrevida de ptes e injertos, n° de infecciones post-tx. En 29/65 ptes (47,5%) se halló VHC. De los factores de riesgo analizados en el pre-tx, el n° de tx previos ( $p=0,01$ ), transfusiones ( $p=0,016$ ) y el tiempo en diálisis ( $p=0,02$ ) fueron significativos. Trece/29 (44,8%) tenían ARN-VHC pre-tx y mantuvieron la positividad. Sólo 5 ptes (38,5%) elevaron ts. Las bx-h mostraron hepatitis crónica persistente. En el post-tx, 3 ptes más positizaron ARN VHC. Ninguno de los restantes elevó ts. Hallamos mayor n° de infecciones en los pacientes VHC(+) (6/29 vs 1/32,  $p=0,01$ ). No hubo diferencias significativas en la sobrevida de ptes e injertos. Las cargas virales fueron de 315630 $\pm$ 241920 CV/ml. Sólo el 17,5% de la población VHC(+) tuvo elevación de ts. Las CV fueron elevadas en ausencia de daño hepático por lo que no serían de utilidad en el monitoreo de enfermedad. La sobrevida de pacientes e injertos post Tx-r, no parece ser afectada por VHC a los 18 meses de seguimiento.

**66. Mapeo rápido de HSV-1 y HSV-2 por DNA Methyltransferases Genotyping (DMG).** Ana M. Jar, Silvia Mundo, M. Nelson\* y O. López

*FCV, UBA y \*Centro de Biotecnología, Univ. Nebraska*

El mapeo de restricción del DNA se basa en el clivaje del DNA en fragmentos mediante enzimas y la separación de los fragmen-

tos resultantes por electroforesis. Esta técnica -RFLP- ha sido usada ampliamente para la detección de patógenos y la caracterización de polimorfismos genéticos. Toda enzima de restricción tiene una metiltransferasa de igual especificidad que puede usarse en su reemplazo para detectar polimorfismos. Como las metiltransferasas modifican el DNA internamente en forma específica sin digestión, la metilación puede ser detectada sin necesidad de electroforesis. Usando (1): amplificación por PCR del DNA con primers biotinilados; (2): metilación con tritio y/o digestión específicas y (3): captura del DNA tritiado sobre bolitas de SPA (Scintillation Proximity Assay) cubiertas con estreptavidina, hemos construido mapas ordenados de un fragmento de 102 pb correspondiente a la DNA Polimerasa de los dos tipos del virus Herpes Simplex. Estos mapas nos permitieron determinar y caracterizar la posición relativa de sitios específicos dentro de la secuencia. Este simple método de mapeo requiere solo 30 min para ser realizado y confirmar la identidad del amplicón. Este método puede ser usado para elaborar mapas ordenados de amplicones de secuencias no conocidas, por ejemplo para estudios epidemiológicos.

- 67. Diseño y validación analítica de PCR cuantitativa competitiva para Citomegalovirus Humano (CMV).** Valeria Mas, Teresita Alvarez, Susana Albano, Constancio Giraud, Graciela de Boccardo

*Hospital Privado, Córdoba*

CMV es causante de morbi-mortalidad en pacientes (ptes) trasplantados renales (tx-r). Es difícil discriminar los ptes con infección o enfermedad por CMV. Desarrollamos una PCR cuantitativa competitiva para diagnosticar CMV de manera sensible y precoz, con capacidad de diferenciar los ptes que evolucionan a enfermedad. Analizamos su validez analítica y utilidad clínica. Esta técnica utiliza un competidor interno (CI) que contiene las secuencias de los primers para el cuarto exón del gen inmediato temprano (IEA) del CMV usado en la PCR cualitativa. El competidor es agregado en el momento de la extracción del ADN y en un nº conocido de copias. La detección y cuantificación fue realizada en placa de 96 pocillos usando sondas específicas para el CI y CMV. Para analizar la utilidad clínica del test, estudiamos 350 muestras de 65 ptes tx-r consecutivos. El ADN fue extraído de sangre periférica y estudiado usando PCR cualitativa. Las muestras (+) fueron reanalizadas usando el ensayo cuantitativo. La sensibilidad analítica de la reacción fue de 10 CV de CMV/10<sup>6</sup> células. La especificidad fue establecida utilizando en la reacción ADN de otros herpes virus. El coeficiente de variación intraensayo fue de 27.3%. El ensayo fue lineal en un rango de concentraciones de 4.5x10<sup>2</sup>-1x10<sup>9</sup>/PBMC. El coeficiente de correlación fue de R<sup>2</sup>=0.999. Las CV de los ptes con enfermedad y sin enfermedad fueron 1438.0±686.6 vs 219.6±117.2 CV/10<sup>6</sup> PBMC (p<0.01). El ensayo cuantitativo tiene validez analítica. Las CV pueden ser utilizadas para identificar ptes con y sin enfermedad por CMV.

- 68. Análisis de la secuencia del virus del sarampión causante del actual brote epidémico (1997/1998).** Alicia S. Mistchenko, PR Barrero

*Laboratorio de Virología, Hospital de Niños R. Gutiérrez; C. Wolff, Dirección de Epidemiología, Ministerio de Salud Pública, Buenos Aires*

El objetivo de este trabajo fue analizar la secuencia del gen de la hemoaglutinina de los virus de sarampión aislados entre octubre 1997 y julio 1998. A partir de secreciones nasofaríngeas de niños con IgM positiva para sarampión se extrajo ARN total y se amplificó directamente por nested-RT-PCR. El producto se secuenció por incorporación directa de ATP- $\gamma$ P<sup>33</sup> con deoxi-dideoxynucleótidos. El análisis se realizó en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes y autorradiografía. Se secuenciaron 48 virus correspondientes a las epidemias del 1991, 1994 y 1997/98. Las secuencias del virus de brote actual presentan una alta homología (diferencias <3.2%) y se agrupan en un

mismo cluster. Por el contrario, los virus causantes de la epidemia de 1991 se agruparon en un cluster divergente. El análisis filogenético molecular permitió demostrar el origen autóctono del actual brote epidémico.

- 69. Diagnóstico inmunológico rápido del Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDB) por DMG.** M Ostrowski, A Pereda, Silvia Mundo, O López

*Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires*

VDB es un virus que infecta terneros produciendo una enfermedad que puede ser leve o complicarse y llevar a la muerte del animal por Enfermedad de las Mucosas. Un diagnóstico que permita determinar la presencia de portadores en forma rápida y que pueda emplearse a campo se constituiría en una herramienta útil para los planes de control. En este trabajo se combinó el uso de metiltransferasas con endonucleasas seguido de Southern blot y la posterior detección inmunológica de DNA metilado en sitios específicos utilizando anticuerpos para 6-metiladenina. Esto añade una nueva dimensión al estudio de los amplicones dado que las secuencias metiladas específicamente son detectadas en fragmentos digeridos por una enzima de restricción con un sitio de reconocimiento diferente. Usamos dos juegos de primers que hibridizan en zonas conservadas del 5' del genoma de los tipos 1 y 2 del VDB y permiten amplificar fragmentos de aproximadamente 160 pb. Todas las reacciones (RT, PCR, metilación y digestión) fueron llevadas a cabo en el mismo buffer que fue diseñado por nosotros para poder realizar todas éstas en la misma mezcla de reacción. Usando esta tecnología pudimos amplificar y caracterizar varios aislamientos de VDB. Esta metodología permite caracterizar los sueros de animales en el mismo día.

- 70. Estudio serológico retrospectivo de presuntos pacientes de fiebre hemorrágica argentina (fha) frente a nuevos arenavirus.** MA Morales, G Calderón, J García, A Ambrosio, J Polop\*, D Enría, MS Sabattini

*INEVH Dr. J. I. Maiztegui. ANLIS, Pergamino; Departamento de Ciencias Naturales UNRC, Río Cuarto*

A la coexistencia de los virus Junín (JUN) y Coriomeningitis Linfocitaria (LCM) en la Pampa Argentina, se agregó recientemente el conocimiento de dos nuevos genotipos de Arenavirus, aislados de roedores, denominados Oliveros (OLV) y Pampa (PAM). Con el objeto de conocer si estos nuevos agentes son capaces de enfermar al hombre, se enfrentaron sueros de 625 pacientes provenientes de esa región entre los años 1991 a 1996, de los cuales sólo 249 (39.8%) tenían diagnóstico confirmado para JUN, el agente etiológico de la FHA. En un tamizaje inicial por IFI con el suero del período convaleciente de cada paciente, surgieron 48 positivos para el antígeno PAM. Sin embargo al titular todos los sueros disponibles de estos pacientes frente a PAM, JUN y LCM se detectaron respuestas serológicas dobles y triples que pueden obedecer ya sea a antígenos compartidos o a infecciones secundarias. La diversidad en las respuestas dobles y triples sugiere una variabilidad antigénica y genómica de las cepas virales que infectaron a los pacientes. Respuestas primarias para un único virus se presentaron sólo con JUN. Ningún paciente fue positivo sólo para PAM o presentó respuestas más elevadas para este virus, por lo cual este agente y el OLV, fuertemente relacionado a PAM, no están produciendo enfermedad en su zona de dispersión o lo están haciendo con muy baja incidencia.

## ENDOCRINOLOGIA II ENDOCRINOLOGIA MOLECULAR

- 71. Deficiencia de 21-hidroxilasa: Detección de 7 mutaciones del gen CYP21B.** L Dain<sup>1,5</sup>, N Buzzalino<sup>1</sup>, A Onetto<sup>3</sup>, S Belli<sup>3</sup>, M Stive<sup>3</sup>, T Pasqualini<sup>4</sup>, O Pivetta<sup>1</sup>, E Charreau<sup>2,5</sup>, L Alba<sup>1</sup>

Centro Nacional de Genética Médica (ANLIS)<sup>1</sup>; Instituto de Biología y Medicina Experimental<sup>2</sup>; Hospital Durand (Servicio de Endocrinología)<sup>3</sup>; Hospital Italiano (Servicio de Endocrinología)<sup>4</sup>; Facultad de Ciencias Exactas y Naturales<sup>5</sup>, Universidad de Buenos Aires

Presentamos los resultados del estudio de 7 mutaciones: Val281Leu(V<sub>281</sub>), A/C-G I<sub>2</sub>, Pro30Leu(P<sub>30</sub>), Cluster E6(E6), I173N(I<sub>173</sub>), Q319X(Q<sub>319</sub>) y delección de 8pb( $\Delta$ 8pb) en 70 alelos correspondientes a 35 pacientes: 24 no clásicos (NC) y 11 clásicos (C) (8 perdedores de sal (PS) y 3 virilizantes simples (VS), afectados de hiperplasia suprarrenal congénita por déficit de 21 hidroxilasa. Se estudiaron además 66 alelos de 33 familiares y 34 de 17 controles. Las mutaciones se detectaron por PCR alelo específica excepto P<sub>30</sub> que se estudió por SSCP. Las frecuencias alélicas halladas fueron: NC: V<sub>281</sub>: 0.19; I<sub>2</sub>: 0.12; E6: 0.02; I<sub>173</sub>: 0.02; Q<sub>319</sub>: 0.08; P<sub>30</sub>: 0 y  $\Delta$ 8pb: 0. C: V<sub>281</sub>: 0.05; I<sub>2</sub>: 0.17; E6: 0.04; I<sub>173</sub>: 0.09; Q<sub>319</sub>: 0; P<sub>30</sub>: 0.06 y  $\Delta$ 8pb: 0.25. Los alelos estudiados en los familiares excluyen mutaciones de novo. Se detectó un portador entre los controles. Los resultados obtenidos sugieren una frecuencia alélica disminuida para V<sub>281</sub> y P<sub>30</sub>. Contrariamente a lo hallado en poblaciones de origen latino, la mutación E6 aparece como causa de la enfermedad en la muestra analizada.

#### 72. Mutaciones del gen cyp21b en pacientes con formas clásica (fc) y no clásica (fnc) de hiperplasia suprarrenal congénita (HSC). Andrea Dardis, B. Geraghty, I. Bergadá, M. Gryngarten, ME Escobar, H. Domené, T. Pasqualini, C. Bergadá, MA Rivarola, A. Belgorosky

Servicios de Endocrinología Hospitales Garrahan y Niños R. Gutiérrez; Pediatría, Hospital Italiano, Buenos Aires

En pacientes con HSC por déficit de 21 hidroxilasa el 25% de las alteraciones del gen CYP21B son delecciones o macroconversiones génicas y el 75% mutaciones puntuales (MP). En 69 pacientes (138 alelos), FC: n=52 (38 perdedora de sal y 14 virilizante simple) y FNC: n=17. Se evaluaron las siguientes alteraciones moleculares del gen CYP21B: Delecciones y macroconversiones génicas, por Southern blot, las MP In2, I172N, Ex 3, R356W, Cluster Ex6, P30L y V281L, por PCR más ASO y Q318X por PCR más digestión con Pst1. Las alteraciones más frecuentes presentes en las FC fueron: Delecciones o macroconversiones (21.1%) e In2 (24%). La MP Q318X presentó una frecuencia elevada comparada con la reportada para población norteamericana (11.5% vs 4.8%), siendo similar a la reportada en población española. El genotipo completo pudo ser establecido en un 73% de los pacientes con la FC y el porcentaje de alelos caracterizados fue del 83.7%. En la FNC la MP más frecuente fue la V281L (50%). El genotipo completo pudo ser establecido en un 58.8%, siendo el porcentaje total de alelos discriminados del 79.2%. Un 29.2% de estos pacientes presentaron en uno de sus dos alelos una alteración asociada a la FC. Las dificultades diagnósticas de algunos pacientes con FNC y el hecho de que los pacientes con FNC puedan ser portadores de una alteración molecular de la FC plantea la relevancia de realizar diagnóstico molecular en este grupo de pacientes.

#### 73. Cinética y regulación hormonal de la expresión del gen CYP19 (Cp450arom) en células testiculares humanas (Cth) en cultivo. Nora Saraco, E. Berensztein, A. Dardis, MA Rivarola y A. Belgorosky

Laboratorio de Investigación, Hospital de Pediatría J.P. Garrahan, Buenos Aires

Hemos reportado previamente al 6to día de cultivo de cTh inmaduras (I), falta de detección del RNAm de cp450arom por RT-PCR revelada con Bromuro de Etidio. Además, la secreción basal de testosterona se incrementaba en las células I pero no en las maduras durante los días de cultivo. El objetivo de este estudio fue evaluar con una técnica molecular más sensible (RT-PCR semicuantitativa con <sup>32</sup>P) la cinética de expresión del gen CYP19

en 2 cultivos de cThI con una edad cronológica (EC) de 0.33 y 3 años (a) los días 2, 4 y 6 de cultivo, y la regulación de la expresión del gen CYP19 bajo rhFSH (2 ng/ml), hLH (10 ng/ml) y rhIGF-1 (50 ng/ml) al 6to día en 3 cultivos de cThI (EC: 0.08, 0.11, 1 a) y en 1 puberal (P) (EC: 15a). Durante los días de cultivo se observó una disminución del RNAm de cp450arom (0.33a: (X±ES) 1.85 ± 0.03, 0.45 ± 0.19, 0.99 ± 0.01 y 3a: 0.44 ± 0.05, 0.07 ± 0.01 y 0.07 ± 0.07 UA, día 2, 4 y 6 de cultivo respectivamente, p<0.05). En los cultivos de cThI el RNAm de cp450arom disminuyó con: rhFSH en 3 de 3, hLH en 2 de 3 y rhIGF-1 en 2 de 2, p<0.05, mientras que no se observaron cambios significativos en el cultivo de cThP. Los resultados obtenidos sugieren que la disminución de la expresión del gen CYP19 durante los días de cultivo en los cThI se asocia con el incremento de la secreción basal de testosterona descrito previamente. Por otro lado la rhFSH, hLH y el rhIGF-1 modulan en forma negativa la expresión del gen CYP19.

#### 74. Expresión de la enzima aromatasa citocromo p450 (cp450<sub>arom</sub>) y de los receptores de estrógenos $\alpha$ y $\beta$ (re- $\alpha$ y $\beta$ ) en craneofaringeomas (cras). Sebastian Oknaian, N. Saraco, A. Dardis, D. Díaz, F. Lubieniecki, A. L. Taratuto, G. Zuccaro, MA Rivarola, A. Belgorosky

Laboratorio de Investigación y Servicio de Patología, Hospital Garrahan, Buenos Aires

Los CRAs son histológicamente neoplasias epiteliales benignas de la región selar. Ha sido descrito una mayor incidencia durante la pubertad y se ha sugerido que los esteroides sexuales podrían afectar el crecimiento de los CRAs. Recientemente se ha descrito la expresión del gen del RE- $\alpha$  en las células epiteliales de los CRAs, sin embargo no existe información disponible sobre la expresión del gen del RE- $\beta$ . 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 cp450<sub>arom</sub> y dilucidar que tipo de RE se expresa en los CRAs. La expresión del RNAm de la cp450<sub>arom</sub> fue evaluada por RT-PCR en 11 CRAs (5 mujeres y 6 varones con una edad cronológica media de 9.36 ± 4.13 años) en presencia de primers marcados con <sup>32</sup>P. La expresión de los RNAm de los REs fue evaluada por RT-PCR en 10/11 CRAs con primers específicos, visualizados en gel de agarosa al 2%, teñidos con BrEt. La amplificación de los fragmentos de 293, 273 y 260 pb correspondientes al cDNA de la cp450<sub>arom</sub>, RE-a y RE-b respectivamente fue observada en todos los casos estudiados. La especificidad de los productos amplificados fue confirmada por digestión con las enzimas de restricción Hinf I y Rsa I (cp450<sub>arom</sub>), Cfo I (RE- $\alpha$ ) e Hinf I (RE- $\beta$ ). Estos resultados sugieren que la cp450<sub>arom</sub> podría estar presente en las células de los CRAs y que podrían coexistir los dos tipos de ERs en estos tejidos, avalando la posibilidad de que las hormonas sexuales modulen el crecimiento tumoral y de que hubiera respuesta a manipulaciones hormonales terapéuticas.

#### 75. Impacto funcional de la transferencia génica mediada por vectores herpéticos en células adenohipofisarias. Federico Bolognani<sup>1</sup>, CG Albariño<sup>2</sup>, V Romanowski<sup>2</sup>, PR Lowenstein<sup>3</sup>, MG Castro<sup>3</sup>, RG Goya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INIBIOLP-Histología B, Facultad Ciencias Médicas, <sup>2</sup>IBBM, Facultad Ciencias Exactas, UNLP; <sup>3</sup>Molecular Medical Unit, University of Manchester, Inglaterra

En estudios previos demostramos que los vectores herpéticos HSV1 derivados del mutante termosensible tsK resultan efectivos para transferir genes en cultivos de células adenohipofisarias (AP) normales y tumorales. En el presente estudio se determinó el efecto de la infección aguda con el vector tsK/ $\beta$ -gal sobre la secreción hormonal de células provenientes de hipófisis normal de rata o de tumores hipofisarios. Luego de 16 h de infección, se midieron los niveles de secreción de prolactina (PRL) y hormona de crecimiento (GH). Se demostró por inmunofluorescencia que el virus infecta efectivamente las células prolactotropas y somatotropas, expresando el transgen indicador. En células AP

normales, multiplicidades de infección de 1, 2 y 5, redujeron en un 28-29% la liberación de PRL y en un 45-50% la de GH. La inhibición correspondiente a células AP de tumores hipofisarios fue de 21-54% para PRL y 46-64% para GH. Se concluye que la transferencia génica en células AP reduce la liberación de PRL y GH, especialmente en las células tumorales.

**76. Interleuquina-1 aumenta la sensibilidad a los glucocorticoides en una línea corticotrofa de ratón (AtT20): efectos sobre la expresión de POMC y liberación de ACTH.** Damián Kovalovsky, Mónica Costas, Eduardo Arzt.

*Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires*

Así como se ha demostrado la importancia de los glucocorticoides como reguladores y controladores de la respuesta inmune, el eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) es regulado recíprocamente por citoquinas. En este trabajo nos centramos en los efectos moduladores que ejerce IL-1 (interleuquina-1) en la hipófisis. Utilizamos una línea celular corticotrófica de ratón (AtT20), y medimos la actividad transcripcional del gen de proopiomelanocortina (POMC) mediante transfecciones con un gen reporter, cloranfenicol acetil transferasa (CAT) bajo el control de este promotor; realizamos ensayos de northern-blot; y analizamos mediante RIA la hormona ACTH liberada al medio de cultivo. Observamos que tanto en los experimentos de transfección, como en los de secreción, un pretratamiento por 20hs con IL-1 (1-100 U/ml) produce un aumento en la inhibición producida por un tratamiento posterior con glucocorticoides (1-100 nM) bajo estimulación por CRH (20-100 nM), (ej: Dex 10 nM no inhibe (0%) a CRH 20 nM, y por priming produce un 35% de inhibición). Sin embargo estos cambios no se ven cuando se analiza el mRNA de POMC, cuya variación se observa solo bajo tiempos más largos de estimulación. Concluimos que IL-1 además de sus efectos directos sobre el eje HPA, ejerce un efecto modulador aumentando la sensibilidad de la línea tumoral hipofisaria AT20 a los glucocorticoides a nivel de la transcripción de POMC y la liberación de ACTH, sugiriendo que fenómenos similares podrían ocurrir en la hipófisis normal.

## HEMATOLOGIA II

**77. Disminución de la respuesta plaquetaria a la epinefrina en trombocitemia esencial (TE) ¿Defecto de membrana o de gránulos densos?** Susana Laguna, JC Pirola, Patricia Vassallu, Felisa Molinas

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

La TE es una enfermedad mieloproliferativa, clonal, que presenta alteraciones de la función plaquetaria siendo la ausencia de respuesta a la epinefrina la más frecuente. Una disminución del número de receptores adrenérgicos y/o del contenido de ADP en los gránulos densos podrían explicar este defecto. Se estudiaron 7 pacientes con TE agrupados en 2 grupos: agregación alterada con adrenalina y normal con ADP y agregación alterada con ambos agonistas. Todos presentaron agregación normal con araquidonato de sodio (AA). Se estudió el binding del receptor adrenérgico con H<sup>3</sup>-yohimbina, la liberación de TXB<sub>2</sub> inducida por adrenalina (ELISA) y el contenido de ADP en los gránulos plaquetarios (mepacrine por citometría de flujo). Los sitios de binding por plaqueta de pacientes y normales fueron 243 y 254 (mediana). La marcación con mepacrine en pacientes y normales fue 53 y 63% (p=0.04) y la liberación de TXB<sub>2</sub> 0.4 y 7.1 ng/ml (p=0.03). No se encontró diferencia entre los dos grupos de pacientes para ninguna de las variables. Los resultados avalarían la existencia de un defecto ubicado entre el receptor y la liberación de AA coincidente con una disminución del contenido de los gránulos densos.

**78. Acción del aluminio sobre eritrocitos circulantes.** Daniela Vittori, Graciela Garbossa, Alcira Nesse.

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

Hemos demostrado que la administración crónica de aluminio (Al) a ratas, induce a la aparición de signos de anemia, aumento de la resistencia osmótica y acortamiento de la vida media eritrocitaria. Para elucidar la acción de Al sobre la eritropoyesis *in vivo*, Al-citrato fue provisto en el agua de bebida a ratas hembras Sprague Dawley (T-Al, n=6). El grupo control (C, n=6) recibió agua. A los 8 meses se observó descenso de Hto (36,8±3,4 vs. 40,6±2,80%; p<0,05), reticulocitosis (2,7±1,26 vs. 1,2±0,20%; p<0,05), disminución de haptoglobina (Hapto) [114 (83-126) vs. 139 (132-149) mg/l, expresada como Mediana (Rango)] y leve incremento de Hb libre en plasma. La microscopía electrónica de barrido reveló, en la sangre periférica de los animales T-Al, anisocitosis y poiquilocitosis con dianocitos, células crenadas y esquistocitos. El análisis de la energía dispersada de rayos X localizó Al en los eritrocitos con anomalías morfológicas. El Al se acumuló en hueso [7,7(5,4-17,3 vs 1,0(0,7-1,2) mg/g]. En cerebro, bazo y riñón la acumulación fue menor pero significativamente mayor que en los controles. Se puede concluir que la ingestión de Al puede afectar la eritropoyesis de ratas a través de la acción sobre glóbulos rojos maduros. La disminución de Hapto, el incremento de Hb libre en plasma, así como la reticulocitosis y la presencia de poiquilocitosis concuerdan con un proceso de hemólisis intravascular que contribuiría a la disminución del volumen globular.

**79. Parametros hemostáticos en el transplante de médula ósea.-** Cristina Duboscq, Claudia Shanley, G Stemmelin, J Ceresetto, O Rabinovich, F Santini, Alejandra Contino, Liza Labra, A Schamun, S Escalante, EO Bullorsky

*Hospital Británico, Buenos Aires*

**Objetivo:** Estudiar los parámetros hemostáticos pre y post transplante allogeneico de médula ósea (TMO). **Población:** **Grupo TMO:** 10 pacientes consecutivos sometidos a TMO con donantes HLA idéntico (hermano). Desde el ingreso recibieron suplemento de vitamina K y profilaxis con heparina de bajo peso molecular (excepto 2 ptes con aplasia medular). Las muestras se tomaron en forma seriada al ingreso (día -7), día 0 (TMO) y +7, +15, +30 días post TMO. **Grupo control (GC):** 10 normales. **Métodos:** Se determinaron TP, APTT, factores de coagulación, Proteína C y Proteína S (método coagulable), antitrombina III, plasminógeno y antiplasmina (amidolítico), factor von Willebrand (nefelométrico) y t-PA y PAI-1 (ELISA). **Resultados:** a) **FVII (%)**: GC: 95(90-100, mediana y rango); -7: 83(55-110); +7: 61 (30-90); +15: 60(35-84)\*\*; b) **ATIII (%)**: GC: 100(80-120); -7: 88(55-100); +7: 79(60-100); +15: 80(60-100)\*\*; c) **PC (%)**: GC: 100(70-130); -7: 93(55-120); +7: 72 (30-115); +15: 70(30-120)\*\*; d) **Fib(mg/dl)**: GC: 330(220-410), -7: 277(195-352); +15: 360(170-488); +30: 328(170-510)\*\*; e) **FvW (%)**: GC: 95(70-130); +15: 150(70-250); +30: 160(75-280). **Conclusiones:** 1) Se encontraron valores disminuidos de FVII, ATIII y PC (p<0.05) en días +7 y +15 con respecto al -7 y al GC. El descenso de ATIII y PC podría deberse a consumo por activación del sistema de coagulación asociado al TMO. 2) Se observó un incremento de Fib, FvW en días +15 y +30 con respecto al -7. 3) Los niveles de tPA y PAI fueron significativamente mayores (P<0.001) que el GC durante todo el estudio. 4) El resto de los parámetros hemostáticos se mantuvieron dentro de rangos normales a lo largo del periodo de estudio.

**80. Cofactor II de la Heparina (HCII) y Dermatán sulfato (DS) en pacientes en hemodiálisis.** Eleonora Rossi, P Porterie, R Vavich, N Cavalli, Lucía Kordich

*Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA; Centro Integral de Nefrología, Buenos Aires*

Se determinó la actividad plasmática de HCII y su potenciador el DS en pacientes en hemodiálisis, y su relación con otros

inhibidores fisiológicos. Se dosó la actividad (act) de Antitrombina III (ATIII), HCII, Proteína C (PC) y DS por métodos amidolíticos, ATIII antigénica (ag) y Proteína S (PS) por inmunoaglutinación. Se estudiaron 22 pacientes en hemodialisis (11 mujeres y 11 hombres) edad 65 años (25-74), Hto 32% (22-44); Índice de adecuación de diálisis (Kt/V) 1,52 (1,0-2,52); tiempo de diálisis 36 meses (2-168). Grupo control (GC) 22 individuos sanos. Los resultados expresados en mediana (rango). ATIIIact 88% (55-120) [GC 100 (80-120)]  $p=0,001$ ; ATIII ag 100% (86-120) [GC 105 (75-125)]  $p=0,59$ ; HCII act 83% (60-105) [GC 98 (75-110)]  $p=0,0001$ ; PCact 76.5% (56-116) [GC 99 (80-120)]  $p=0,005$ ; PSag 93% (79-105) [GC 98 (70-120)]  $p=0,007$ ; DS 0,21  $\mu\text{g/ml}$  (0-1,5) [GC 0]  $p=0,0002$ ; diuresis 24 hs 600 ml (50-2000). Los valores hallados de PC, PS y ATIII coinciden con lo descrito en la literatura. De los resultados evaluados destacamos los niveles de HCII y la presencia de DS en circulación en pacientes en hemodiálisis con una ligera correlación negativa del DS con la diuresis ( $r: -0,56$ ).

**81. Acción del fibrinógeno (Fg) en la modulación de la actividad inhibitoria de trombina (Th) del Cofactor II de la Heparina (HCII).** Eleonora Rossi, Cristina Duboscq, Lucía Kordich

*Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.*

Se estudió la acción del Fg en la capacidad inhibitoria de Th del HCII potenciada por el Dermátan Sulfato (DS). Se incubó con HCII (0,002 PEU/ml), DS (0,25 g/l), Th (10 nM) y Fg (0,06 g/l) a 37°C. Se midió la actividad de Th residual por método amidolítico a 1, 10 y 20 min ( $n=3$ ). Los resultados se expresan como % de inhibición de Th (% InTh) media  $\pm$  SD a 1,10 y 20 min. **Resultados:** A- HCII+DS inc 2 min +Th: %InTh 43 $\pm$ 0,5; 82 $\pm$ 0,5; 85 $\pm$ 1,0 B -HCII+DS+Fg inc 2 min +Th: %InTh 49 $\pm$ 1,0; 75 $\pm$ 0,5; 82 $\pm$ 0,5 C- HCII+Fg inc 2 min +DS+Th: %InTh 47 $\pm$ 0,5; 49 $\pm$ 0,5; 58 $\pm$ 0,5 D- Fg+DS inc 2 min +HCII+Th: %InTh 42 $\pm$ 0,5; 78 $\pm$ 1,0; 85 $\pm$ 1,0. Realizamos el ensayo C con distintos tiempos de incubación (3, 6 y 20 min) y Fg de 0,06 g/l. E- HCII+Fg inc 3 min +DS+Th: %InTh 47 $\pm$ 0,5; 49 $\pm$ 0,5; 58 $\pm$ 0,5. F- HCII+Fg inc 6 min +DS+Th: %InTh 42 $\pm$ 1,0; 48 $\pm$ 0,5; 55 $\pm$ 0,5. G- HCII+Fg inc 20min +DS+Th: %InTh 25 $\pm$ 0,5; 32 $\pm$ 0,5; 32 $\pm$ 0,5. Se investigó la acción de la concentración de Fg en la actividad de HCII con incubaciones de 2 min: H- HCII+Fg 0,06g/l +DS+ Th: %InTh 41 $\pm$ 0,5; 48 $\pm$ 0,5; 55 $\pm$ 1,0. I- HCII+Fg 0,18g/l +DS+Th: %InTh 32 $\pm$ 1,0; 38 $\pm$ 0,5; 39 $\pm$ 0,5. Estos resultados sugieren que el fibrinógeno podría modular la inhibición de trombina por el HCII de forma concentración y tiempo dependiente. Esta modulación podría enfatizar el estado protrombótico en pacientes con niveles elevados de fibrinógeno.

**82. Efecto del factor estimulador de colonias granulocíticas (G-CSF) y de la trombopoyetina (TPO) sobre los polimorfonucleares (PMN).** R Pozner, M Schattner, G Collado, A Gorostizaga, MA Lazzari

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

El TPO junto con otros factores de crecimiento representa una estrategia terapéutica para el tratamiento de aplasias medulares. Evaluamos el efecto del TPO y del G-CSF sobre los PMN. La expresión basal de CD11b por citofluorometría y expresada como la mediana de la intensidad de fluorescencia (196 $\pm$ 15,  $n=5$ ) aumentó por estimulación de los PMN con G-CSF (234 $\pm$ 21) pero no con TPO (207 $\pm$ 17). El tratamiento con ambas citoquinas arrojó valores similares (233 $\pm$ 16) a los obtenidos con G-CSF solo. La preincubación con G-CSF (293 $\pm$ 21) pero no con TPO (244 $\pm$ 19), aumentó los niveles de CD11b inducidos por una concentración subumbral de FMLP (236 $\pm$ 20). La potenciación por G-CSF no se alteró por la presencia de TPO (276 $\pm$ 19). Tanto el TPO como el G-CSF solos o en combinación no modificaron los niveles basales de agregados mixtos de PMN y plaquetas evaluados por citometría de flujo. Los resultados sugieren que el aumento de la expresión de CD11b por G-CSF no se modifica por TPO y el mismo no se traduce en la formación de agregados mixtos entre PMN y plaquetas.

## TUMORES II FISIOPATOLOGIA TUMORAL

**83. Efectos biológicos de TGF $\beta$ s sobre la línea tumoral murina LM3.** M Cecilia Daroqui, Mariana Salatino\*, AJ Urtreger, Patricia Elizalde\*, Lydia Puricelli, Elisa Bal de Kier Joffé

*Instituto de Oncología A.H. Roffo, Instituto de Biología y Medicina experimental, Buenos Aires*

La familia de factores de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ) regula los procesos de proliferación y remodelación tisular. Se estudió el rol del sistema TGF $\beta$  sobre el crecimiento y la producción de enzimas relacionadas con la invasión tumoral (uPA y MMP) en la línea LM3. Por Western blot se determinó que las células LM3 expresan receptores tipo I y II para TGF $\beta$ s. La proliferación de las células LM3 no fue modulada por las isoformas TGF $\beta$ 1, 2 y 3 (0.004 a 40 ng/ml), medida por incorporación de TdH3, recuento, índice mitótico y análisis del ciclo celular por citometría. Los TGF $\beta$ s inhibieron el crecimiento de células epiteliales no tumorales Mv1Lu. Sin embargo, todas las isoformas aumentaron la actividad metabólica celular (MTS), tanto en Mv1Lu como en LM3 (-1,5 veces de aumento luego de 24 h de tratamiento con 4ng/ml de TGF $\beta$ s). TGF $\beta$ 1 estimuló en forma significativa y dosis dependiente la secreción de MMP, medida por zimografía cuantitativa en medios condicionados (0,32 $\pm$ 0,01 y 0,16 $\pm$ 0,02 UA/ng proteína en células tratadas con 40 y 4 ng/ml respectivamente, siendo la actividad no detectable en el control). TGF $\beta$ 1 (4ng/ml, 24h) también estimuló la secreción de uPA medida por caseinólisis radial (4,3 $\pm$ 1,0 UI/ng proteína vs 1,9 $\pm$ 0,4 en el control). Las células LM3, a diferencia de las células normales, mostraron resistencia a la inhibición de crecimiento de los TGF $\beta$ s. Sin embargo, estos factores activan alguna(s) vía de señalización que induce la secreción de enzimas claves en la diseminación metastásica.

**84. Mecanismos de respuesta al Factor de Transformación  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) en células epiteliales de carcinomas mamarios murinos.** M Salatino, L Labriola, EH Charreau, PV Elizalde

*Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires*

Se sabe que el TGF- $\beta_1$  inhibe la proliferación de células epiteliales arrestándolas en la fase G1 del ciclo celular. El arresto estaría parcialmente atribuido a los efectos regulatorios del TGF- $\beta_1$  sobre la expresión y la formación de complejos de proteínas del ciclo celular: ciclinas y cdk. En nuestro trabajo demostramos que el TGF- $\beta_1$  [1 ng/ml] inhibe la proliferación de cultivos primarios de células epiteliales de tumores ductales hormono dependientes (HD): (Ctrol:201 $\pm$ 25 cpm, MPA:582 $\pm$ 68 cpm, MPA+TGF- $\beta_1$ :135 $\pm$ 20 cpm), determinada mediante ensayos de incorporación de timidina [ $^3\text{H}$ ]. Las proteínas extraídas de estos cultivos fueron analizadas por Western Blot. Se detectó una significativa disminución en la expresión de ciclina D, A, E, y cdk $_2$ . Cultivos primarios de células epiteliales de tumores lobulillares hormono independientes (HI) presentan resistencia a la inhibición por TGF- $\beta_1$ , esto podría deberse a la disminución de los receptores de superficie Tipo II de TGF- $\beta$ , que fueron significativamente menores en los tumores HI lobulillares que en los HD. Estos resultados indicarían que el efecto provocado por TGF- $\beta_1$  en la inhibición del crecimiento estaría determinado por una disminución en la expresión de las proteínas involucradas en la progresión del ciclo celular. Además, la resistencia a la inhibición por TGF- $\beta_1$  estaría en parte mediada por la cantidad de receptor tipo II de TGF- $\beta$  expresados.

**85. Efecto de compuestos adrenérgicos en nuevas líneas tumorales de mama humana.** Stella Maris Vázquez, Isabel Alicia Luthy.

*Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires*

Describimos que en células de cáncer mamario humanas MCF-7 los agonistas adrenérgicos Epinefrina (Epi) y Clonidina (Clo) esti-

mulan la incorporación de Timidina tritiada por un mecanismo  $\alpha_2$ . Con el objeto de estudiar si los mecanismos eran similares en diferentes líneas tumorales que hemos desarrollado a partir de tumores primarios de mama humana, se incubaron las células durante 3 días en presencia de agonistas y antagonistas adrenérgicos, con cambio de medio todos los días e incorporación de 0,2 mCi de Timidina tritiada durante 24 hs. Por ejemplo, en la línea llamada MH-7, Epi produce un aumento significativo de la incorporación de Timidina tritiada (Control (C): 2915  $\pm$  125 cpm; Epi 1  $\mu$ M: 4272  $\pm$  148,  $p < 0,001$ ). Tanto el antagonista  $\alpha_2$ -Yohimbina como el  $\alpha_1$ -Prazosin revirtieron el efecto, sugiriendo la presencia de sitios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ . En la línea MH4, Epi disminuyó significativamente (C: 3134  $\pm$  131; Epi 0,1 nM: 2532  $\pm$  109, Isoproterenol ( $\beta$ ): 2068  $\pm$  72;  $p < 0,01$ ). Clo en cambio estimuló este parámetro (C: 1506  $\pm$  32; Clo 10 fM: 1931  $\pm$  25,  $p < 0,001$ ); sugiriendo sitios  $\alpha_2$  y  $\beta$ . La presencia de diferentes tipos de receptores adrenérgicos ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\beta$ ) en las líneas tumorales causarían efectos diferentes y aún opuestos sobre la proliferación celular.

**86. Acción de la histamina sobre la proliferación de una línea celular de carcinoma de páncreas humano.** Graciela Cricco, Florencia Labombarda, Rosa Bergoc, Claudia Cocca, Elena Rivera, Gabriela Martín

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

En la línea celular PANC-1 se determinó la sobreexpresión de dos tipos de receptores a histamina (Hi) RH<sub>1</sub> y RH<sub>2</sub>. El estudio de los segundos mensajeros asociados demostró que la Hi a través de los RH<sub>2</sub> estimula tanto la producción de AMPc (CE<sub>50</sub> 290  $\pm$  20 nM) como la de inositol fosfato (IP) (CE<sub>50</sub> = 25  $\pm$  8 nM). En cambio, la estimulación de RH<sub>1</sub> sólo aumenta los IP. Empleando un RIA se comprobó que estas células sintetizan (1,6 ng/10<sup>6</sup> cél) y liberan Hi al medio (2.5  $\pm$  lnM). Estudios de proliferación utilizando el método clonogénico de formación de colonias, demostraron que la Hi actuando a través del RH<sub>2</sub> inhibe la proliferación (Control 120  $\pm$  12 col; Hi 1 mM: 57  $\pm$  8 col,  $p < 0,01$ . Agonista H<sub>2</sub> 1 mM: 83  $\pm$  5 col,  $p < 0,05$ ). El empleo de forskolina 8 mM: (55  $\pm$  7 col,  $p < 0,01$ ), confirmó la asociación de niveles elevados de AMPc con la inhibición de la proliferación. Basándonos en estos resultados podemos concluir que la línea PANC-1 es un excelente modelo para el estudio del papel de la Hi como factor de crecimiento en neoplasias humanas.

**87. Producción de interleuquina-1  $\beta$  y fibronectina por fibroblastos de médula ósea de pacientes con tumores sólidos. Producción de interleuquina-1  $\beta$  y fibronectina por fibroblastos de médula ósea de pacientes con tumores sólidos.** Alba E Honegger, E Hoffer, RI Barañao, RH Bordenave, LS Rumi, NA Chasseing.

*Instituto de Biología y Medicina Experimental y Hospital I. Iriarte, Buenos Aires.*

En trabajos anteriores encontramos una deficiente capacidad proliferativa y de confluencia de los progenitores fibroblásticos (PF) de médulas ósea (MO) de pacientes con cáncer avanzado de pulmón y mama (PCP y PCM), libres de tratamiento. Observaciones estas que se encontraron tanto en el cultivo primario de MO como en los sucesivos subcultivos. Por este motivo, en la presente investigación se estudió si los PF puros, (4 subcultivos) de las MO de los pacientes y voluntarios sanos (VS) eran capaces de producir espontáneamente Interleuquina 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y fibronectina (Fb), ambos factores mitogénicos de estas células. La IL-1 $\beta$  y Fb fueron medidas en los sobrenadantes del cultivo de 5x10<sup>4</sup> PF (prolil-4-hidroxilasa y fosfatasa alcalina +) después de 72hs de incubación, utilizándose un kit de ELISA. **Resultados:** IL-1 $\beta$  (pg/ml): PCP= <10; PCM=<10 y VS=1217  $\pm$  74. Fb (mg/ml): PCP= 9,0  $\pm$  1,5; PCM= 5,3  $\pm$  1,9 y VS= 14,8  $\pm$  1,6, ( $p < 0,05$  y  $< 0,01$  respecto VS, respectivamente), con un n=6 por grupo. **Conclusión:** Los PF de MO de los pacientes presentaron una disminución significativa en la producción de IL-1 $\beta$  y Fb, resultados

que podrían explicar en parte la deficiente capacidad de clonado de estos precursores estromales.

**88. Cambios precoces en los hepatocitos inducidos por deficiencia de colina.** Mirian Matoso, Adriana Descalzo, Silvia Fariña, E A Porta, A J Monserrat

*Centro de Patología Experimental, Facultad de Medicina, UBA y Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Hawaii, USA*

En la deficiencia de colina, focos preneoplásicos y carcinoma hepatocelular se observan meses más tarde a la exposición dietaria pero la transformación celular que conduce a la carcinogénesis ocurriría en períodos tempranos. A fin de explorar los sucesos que tienen lugar en estas etapas tempranas, ratas Wistar macho de 200 grs fueron alimentadas durante 0, 2, 4, 8 y 16 días con dietas deficientes (CD) o suplementadas (CS) con colina. Los resultados obtenidos al estudiar los hígados de dichos animales fueron: 1) aumento de la actividad proliferativa cuantificada con H:E: y marcación con PCNA (día 4, CD: 10.0  $\pm$  5.9; CS: 0.0  $\pm$  0.0,  $p < 0,05$ ), 2) inducción de apoptosis (ApoTag, día 4, CD: 0.86  $\pm$  0.2; CS: 0.22  $\pm$  0.0,  $p < 0,01$  y 3) detección de hepatocitos transformados con la enzima GST-p (día 4, CD: 224.3  $\pm$  45, CS: 0.05  $\pm$  0.0,  $p < 0,05$ ). Estos hallazgos muestran que los eventos que conducen a la transformación celular en la deficiencia de colina se producen precozmente y que la inducción de los fenómenos apoptóticos sería insuficiente para eliminar los hepatocitos alterados favoreciendo su persistencia

## NEUROCIENCIAS II

**89. Regulación por esteroides del ARNm para GAP-43 en motoneuronas del Wobbler (Wr), modelo murino de esclerosis lateral amiotrófica.** M. Claudia González Deniselle, Claudia Grillo, Susana González, Paulina Roig, A.F. De Nicola.

*Instituto de Biología y Medicina Experimental y Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires*

La proteína asociada al crecimiento GAP-43 se expresa durante el estado embrionario, post-injuria y en la neurodegeneración. Empleando una oligosonda e hibridización *in situ* se comparó la expresión del GAP-43 ARNm en asta ventral de ratones normales y Wr que presentaban atrofia neuronal, gliosis, temblor y dificultad ambulatoria. Un grupo recibió un pellet (50 mg) de corticosterona (CORT) o del esteroide antioxidante U-74389F por 4 días. GAP-43 ARNm se hiperexpresó en motoneuronas de Wr no tratados con respecto a controles (~ 200 vs. 20 granos/célula;  $p < 0,001$ ). El tratamiento con CORT o U-74389F no modificó los ínfimos niveles de controles. En Wr+CORT, el ARNm para GAP-43 descendió 41% (Wr: 187.7  $\pm$  6 vs. Wr+ CORT.: 110  $\pm$  15;  $p < 0,001$ ). U-74389F produjo un descenso de 36.5% (Wr : 197  $\pm$  9 vs. Wr+ U-74389F 125  $\pm$  8;  $p < 0,001$ ). Dado que CORT emplea mecanismos genómicos y no genómicos mientras que U-74389F es activo sobre membranas, es posible que CORT, un esteroide natural, actúe en forma no genómica. Datos de la literatura demostraron ausencia de HRE en este gen. Sugerimos que los esteroides revierten la expresión aberrante de GAP-43 originada en la desnervación y/o atrofia muscular presentes en este modelo. (Subsidiado por PIP 4103, CONICET y MT13, UBA)

**90. El sulfato de pregnenolona (PS) potencia el efecto liberador de LH ejercido por el n-metil-d-aspartato (NMDA) en ratas macho.** P Arias, A Valerani, E Cerrato, J Moguilevsky.

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

**Objetivos:** evaluar el efecto del PS (un neuroesteroide con efecto anti-GABAérgico) sobre la liberación de LH estimulada por

NMDA en ratas macho adultas. **Metodología:** 1) animales macho provistos de cánulas yugulares, y pretratados 60 min antes con PS (10 mg/kg s.c.) o vehículo oleoso, recibieron NMDA (15 mg/kg) o salina i.v.; 2) anterohipófisis de animales macho fueron incubadas con LHRH (10 nM), con o sin el agregado de PS (10 nM). Se midió la liberación de LH (RIA); las diferencias fueron evaluadas mediante un ANOVA y la prueba de Tukey-Scheffé. **Resultados:** NMDA o PS, por sí solos, no indujeron un aumento significativo en los niveles de LH; la combinación de ambos incrementó significativamente ( $p < 0.02$ ) la LH circulante a los 20 min de administrado el NMDA. La liberación de LH por parte de anterohipófisis en incubación (basal o estimulada por LHRH) no fue afectada por el PS en forma significativa. **Conclusión:** el PS aumenta la liberación de LH inducida por NMDA, actuando, muy probablemente, por un mecanismo central (inhibición del tono GABAérgico o incremento del flujo de  $Ca^{2+}$  inducido por el agente glutamatérgico).

**91. Efecto ansiolítico de allopregnanolona en ratas hembras en diferentes condiciones hormonales.** M Laconi, M Casteler, R Cabrera

LINCE-FCM-CRICYT, Mendoza

Los neuroesteroides son moléculas derivadas de las hormonas esteroideas, sintetizadas en el sistema nervioso central. La Allopregnanolona (All), es uno de los más estudiados como modulador del sistema GABAérgico. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de All en ratas hembras ante una situación ansiogénica. Se utilizaron ratas hembras en ciclo y ovariectomizadas (OVX). Los grupos experimentales fueron: diestro, ( $D_1$ ) estro (E), OVX impregnadas (estrógeno, progesterona) y OVX sin impregnar. All (5,2 $\mu$ M) o solución Krebs (KRB) fueron administradas intracerebroventricularmente. El test seleccionado fue la enrucijada elevada (Plus maze). Se cuantificó el tiempo de permanencia en el brazo abierto y cerrado (TPBA-TPBC), tiempo de permanencia en el extremo abierto distal (TPEAD), número de entradas en el brazo abierto y cerrado (NEBA-NEBC). All indujo un aumento significativo en TPBA y TPEAD en E y OVX impregnadas respecto a los controles. Concluimos que All alteraría patrones comportamentales inducidos por situaciones ansiogénicas. el cual estaría condicionado por la activación previa de receptores de estrógeno y progesterona.

**92. Efecto de la falta de predicción sobre el status social de ratas.** Lorena Rela, AP Lemoine, ET Segura.

Facultad Psicología, UBA & Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires.

El síndrome de desamparo aprendido (SDA), atribuido a la falta de control sobre estímulos aversivos, fue obtenido también con la aplicación de estímulos no predecibles. Ratas sometidas a shocks inevitables y no señalizados alteran su conducta individual y parámetros relacionados con fisiología de catecolaminas, no así animales sometidos a shocks inevitables y señalizados. El valor potencial del SDA como modelo animal de depresión mayor, nos llevó a modelar otro aspecto característico y diagnóstico de ésta: la alteración en la conducta social. Datos previos sugieren que la conducta de animales dominantes sometidos al protocolo de SDA podría llevar a una pérdida de status jerárquico. **Método:** se formaron parejas de ratas Sprague Dawley macho un mes antes de la manipulación, que consistió en: a) determinación de dominancia en cada pareja (desempeño de ambas ratas privadas de agua, para obtener este recurso limitado). b) shocks predecibles o no predecibles a animales dominantes, c) igual que en a). **Resultados:** Luego del tratamiento con shocks no predecibles, diferencias en el score de dominancia entre animales dominantes (0.98 $\pm$ 0.04) y subordinados (0.55 $\pm$ 0.10) desaparecen (0.99 $\pm$ 0.06 y 0.93 $\pm$ 0.10), y niveles de agresión en dominantes tienden a disminuir. **Conclusiones:** Los datos sugieren una disminución del status de los animales dominantes, brindando un elemento de apoyo al SDA como modelo de depresión mayor.

**93. Reacción de la 6-hidroxidopamina y el óxido nítrico: formación de peroxinitrito.** NA Riobó, FJ Schöpfer, PV Finocchietto, JJ Poderoso

Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires

La administración de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) produce enfermedad de Parkinson (EP) en forma experimental aunque se desconoce el mecanismo de degeneración dopaminérgica. El óxido nítrico ( $\cdot$ NO) participa en el proceso degenerativo en otros modelos de EP, pero no ha sido vinculado al efecto de la 6-OHDA. El objetivo fue evaluar una posible reacción entre el  $\cdot$ NO y la 6-OHDA y sus productos finales. Se observó espectrofotométricamente la aparición de la forma oxidada de la 6-OHDA tras la adición de un pulso de  $\cdot$ NO. La cinética de oxidación de 6-OHDA resultó lineal con el  $\cdot$ NO ( $r=0.99$ ). Se calculó el valor de la constante de reacción en  $10^4 M^{-1} seg^{-1}$  a través del decaimiento de 1  $\mu$ M  $\cdot$ NO variando la concentración de 6-OHDA y con 30  $\mu$ M 6-OHDA, variando la concentración de  $\cdot$ NO. Se observó por Western blot la nitración de albúmina, marcador de la existencia de peroxinitrito (ONOO $\cdot$ ), expuesta a 6-OHDA (200 $\mu$ M) y  $\cdot$ NO (600 $\mu$ M). Los resultados sugieren las siguientes reacciones: 1) 6-OHDA +  $\cdot$ NO  $\rightarrow$  6-OHQ $\cdot$  + NO $\cdot$ , 2) 6-OHQ $\cdot$  + O $_2$   $\rightarrow$  6-OHQ + O $_2^{\cdot-}$ , 3)  $\cdot$ NO + O $_2^{\cdot-}$   $\rightarrow$  ONOO $\cdot$ . Se concluye que la formación de peroxinitrito en las neuronas dopaminérgicas por la presente reacción podría mediar el efecto tóxico de la 6-OHDA.

**94. Efecto de dopamina en el rol modulador del sistema opioide sobre la secreción de prolactina al final de la preñez en la rata.** M Soaje, C Bregonzio, R Cabrera, R Deis

LARLAC-LINCE-CRICYT, Mendoza

Los opioides endógenos (SO) ejercen un rol modulador-inhibidor sobre PRL. Dopamina (DA) ejerce un tono inhibitorio en la secreción de PRL. El objetivo de este trabajo fue establecer la participación de DA como modulador del SO al final de la preñez. Ratas con 19 días de preñez, pretratadas con RU-486 (5 mg/kg sc, 8 h) o aceite, recibieron una inyección i.p. de naloxona NAL (2mg/kg, 17:30 h). Luego de 30 min las ratas se decapitaron, y en los hipotálamos medio basales (HMB), se determinó DA y DOPAC por HPLC y PRL sérica por RIA. RU-486 no modificó los niveles de PRL (7.11 $\pm$ 1.54 vs 5.22 $\pm$ 0.55) pero indujo una caída de la actividad dopaminérgica (0.23 $\pm$ 0.02 vs 0.06 $\pm$ 0.01 ng/mg,  $p < 0.01$ ). NAL incrementó PRL (115.20 $\pm$ 33.02 ng/ml vs control,  $p < 0.01$ ) sin modificar el índice de recambio (0.06 $\pm$ 0.01 vs control). Se evaluó la liberación de  $^3$ HDA inducida por ( $K^+$ ), como índice de la actividad dopaminérgica del HMB (método de superfusión). Utilizando ratas en idéntica preparación a la descripta anteriormente RU-486 no modificó la liberación (82 $\pm$ 25 vs 80 $\pm$ 30%) y captación de  $^3$ HDA. NAL facilitó la liberación de  $^3$ HDA en ambos grupos (V+NAL: 254 $\pm$ 51%,  $p < 0.05$ ; RU+NAL: 233 $\pm$ 43%,  $p < 0.05$ ) sin modificar la captación. Concluimos que RU-486 no alteraría la liberación y captación de DA en el HMB. Sin embargo, el bloqueo de los receptores de Pg es capaz de inducir una caída del tono dopaminérgico en el HMB en este día.

## ENDOCRINOLOGIA III ENDOCRINOLOGIA Y METABOLISMO

**95. La tiroxina per se activa la termogenesis de la grasa parada en el frío.** AA Zaninovich, IR Miglione, M Raices, M Pavia, K Hagmüller

Hospital de Clínicas Jose de San Martín e INGEBI, Buenos Aires; Departamento de Zoología, Universidad de Graz, Austria

El aumento de la proteína desacoplante (UCP) del BAT en el frío, es promovido por la noradrenalina y la T3. El presente traba-

jo estudió si el boqueo de la conversión de T4 a T3 (considerada imprescindible para algunos autores) alteró el "binding" del GDP a la UCP, que es un índice de termogénesis activada. Se usaron ratas hipotiroideas tratadas con T4 (grupo control), T4 más ácido iopanoico, que bloquea la conversión de T4 a T3 (grupo T4/IOP) o T3. Se midió el binding del GDP en mitocondria de BAT usando ( $^3\text{H}$ )GDP y ecuación de Scatchard. Grupo control: el binding fue de  $242 \pm 24$  pg/mg prot. luego de 24 h en el frío y  $403 \pm 25$  pg luego de 10 días a  $4^\circ\text{C}$ . Grupo T4/IOP: Los valores fueron  $175 \pm 23$  pg/mg prot. y  $389 \pm 45$  pg/mg prot. respectivamente. Grupo T3: El binding fue de  $125 \pm 23$  pg/mg prot. y  $186 \pm 18$  pg/mg prot. respectivamente. La mitad las ratas tratadas con T3 murieron de hipotermia por insuficiente activación del BAT. La T4 *per se* puede activar la síntesis de UCP, aunque normalmente debe deiodinarse a T3 para realizar esa función.

**96. Aporte yodado y autoinmunidad tiroidea durante el embarazo.** V Namer, M Torres, DH Sánchez, S Quiroga, L Díaz, A Florín

*C.E.M.I.C. y Cátedra de Química Analítica Instrumental, Universidad de Buenos Aires*

**Objetivo:** Determinar el aporte yodado, la función tiroidea y la prevalencia de la auto-inmunidad tiroidea en la mujer embarazada en la ciudad de Buenos Aires. **Metodología:** Se constituyeron tres grupos: control (mujeres no embarazadas)  $n=15$ , primer trimestre de embarazo  $n=14$  y tercer trimestre de embarazo  $n=17$ , en los cuales se efectuaron los siguientes análisis: dosaje de yodo en orina de 24 horas por método potenciométrico, determinación cuantitativa de la TSH sérica y de la T4 libre por ELISA (Enzymutest TSH Boehringer y enzymun-test FT4 Boehringer respectivamente) y dosaje de los anticuerpos anti-tiroperoxidasa (anti-TPO) y anticuerpos anti-tiroglobulina (anti-Tg) por método directo (RSR). **Resultados:** El aporte yodado promedio fue de 740mg/día (VN: 150 a 300mg/día), en los tres grupos. Los valores de la TSH y de la T4 libre se encontraron en el rango normal en todos los grupos. La presencia de anticuerpos antitiroideos (anti-Tg y/o anti-TPO) se encontró en el 18% de los sujetos. **Conclusión:** Dado la fuerte prevalencia de auto-inmunidad tiroidea en esta población, probablemente favorecida por un elevado aporte yodado, se sugiere un estudio longitudinal y una búsqueda de auto-inmunidad tiroidea sistemática en la mujer embarazada ya que la presencia de anticuerpos es orientadora de patología tiroidea y obstétrica.

**97. Caracterización de tirosina fosfatasas acth-dependientes en zona fasciculata de adrenal de rata.** Fabiana Cornejo Maciel, Cristina Paz, EJ Podestá

*Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires*

En trabajos previos hemos demostrado la participación obligatoria de fosfatasas sensibles a vanadato, regulables via proteína quinasa A, en el mecanismo de activación de la esteroidogénesis por ACTH y LH. El presente estudio estuvo dirigido a caracterizar parcialmente la(s) tirosina fosfatasa(s) involucrada(s) en dicho mecanismo. Para ello se utilizó un ensayo de tirosina fosfatasa que permite la caracterización molecular simultáneamente con la medición de la actividad hormono dependiente. Se marcó poliglucámico-Tirosina (pGT) con [ $^{32}\text{P}$ ]ATP utilizando receptor de EGF e insulina como tirosina quinasas (purificados, fuente comercial). Se realizó el cross-linking del sustrato marcado en tirosina con acrilamida para ser utilizado en SDS-PAGE. Las proteínas citosólicas de ZF de adrenal de rata se separaron por electroforesis y la actividad de tirosina fosfatasas se evidenció en el mismo gel por autorradiografía. La desfosforilación del pGT se observó como regiones donde el  $^{32}\text{P}$  ha sido selectivamente removido. Con esta metodología se detectó la presencia de tres isoformas de masa molecular 50, 80 y 110 kDa. ACTH (1 nM) incrementó la actividad de las tres isoformas. Ninguna de ellas corresponde a la PTP1D, que se regula por cAMP-PKA. Estos resultados demuestran la existencia de más de una isoforma de PTP involucrada en el mecanismo de acción de ACTH.

**98. Caracterización de los sustratos endógenos de tirosina fosfatasas ACTH-dependientes en zona fasciculata de adrenal de rata.** Cristina Paz, Fabiana Cornejo Maciel, Cecilia Poderoso, EJ Podestá

*Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires*

Previamente demostramos que las proteínas tirosina-fosfatasas (PTPs) participan en la activación hormonal de la esteroidogénesis y que, en zona fasciculata (ZF) de adrenal, ACTH incrementa la actividad de fosfatasas sensible a vanadato, lo cual sugiere la existencia de PTPs y fosfotirosina proteína(s) (pTp) que regulan la esteroidogénesis adrenal. El objetivo del presente estudio fue identificar los sustratos endógenos de la PTPs involucradas en dicho mecanismo. Para ello se monitoreó la actividad de fosfatasas utilizando un sustrato específicamente fosforilado en tirosina (RCM- $^{32}\text{P}$ ]lisozima) y paralelamente la defosforilación endógena por Western blot con anticuerpos anti-P-tirosina. La administración de ACTH incrementó rápidamente la actividad de PTPs medida con RCM- $^{32}\text{P}$ ]lisozima: fue significativamente superior al control luego de 5' de estimulación (control  $36,8 \pm 0,5$  vs ACTH  $43,7 \pm 0,4$  mU/mg proteína,  $p < 0,05$ ) y alcanzó un máximo a los 15'. 8BrcAMP produce el mismo efecto. El análisis de los sustratos endógenos reveló la defosforilación específica de dos proteínas de masa molecular 120 y 55 kDa en microsomas y una de 55 kDa en citosol. La activación de PTPs correlacionó con la defosforilación de sustratos endógenos. Estos resultados indican que ACTH y cAMP producen una rápida activación de PTPs y que por lo menos 3 pTp estarían involucradas en el mecanismo de acción de ACTH.

**99. Efectos óseos del opioidismo (OPD) descriptos por variación del umbral de atenuación tomográfica (pQCT).** M Parma, P Schneider, M Braun, E Piccinni, Nélida Mondelo, JL Ferretti

*Gador, Buenos Aires; CEMFoC, UNR, Rosario; Universidad de Würzburg, Alemania.*

Analizamos por pQCT las metáfisis femorales de ratones BALB/c, normales o hipercalcémicos por trasplante de tumor PO7 (Instituto Roffo), sin otro tratamiento (N, T) o tratados con 1 ó 3 mg/kg/d sc de OPD desde el implante (T+OPD), ú 8.4 mg/kg/3d (N+OPD) por 28 d ( $n=6-8$ /grupo). Como la condensación del trabecular por OPD impidió su distinción del cortical, analizamos la distribución de valores de área ósea y contenido o densidad mineral volumétricos variando el umbral de atenuación del aparato (UA) dentro de todo el rango disponible. Las pérdidas (T) o ganancias de masa ósea (OPD) predominaron a  $UA = 0.7 \text{ cm}^{-1}$  en N y T, y a  $0.9 \text{ cm}^{-1}$  en N+OPD y T+OPD, indicando que a) el tumor redujo la masa ósea ( $p < 0.001$ ) y volvió indetectable al hueso cortical, y b) el OPD protegió al hueso trabecular contra la remodelación hasta hacerlo igual ó más denso que el cortical normal para la especie. Proponemos la novedosa técnica empleada para la investigación esquelética.

**100. Distinción Biomecánica Práctica Entre Osteopenias Y Osteoporosis.** J L Ferretti, R Capozza, G Cointry, JR Zanchetta, HM Frost.

*CEMFOC, UNR, Rosario; IDIM/FIM, Buenos Aires; S.Colorado Clinic, Pueblo, USA*

Proponemos 2 mecanismos etiopatogénicos para las osteopatías fragilizantes: la descarga mecánica (osteopenia por desuso) y el corrimiento del setpoint del mecanostato óseo (fragilidad ósea «sintomática»). Desarrollamos al efecto 2 curvas de referencia ( $n=1450, 100$ ) que permiten: 1) una cuantificación densitométrica de la osteopenia referida a la masa muscular regional para cada sexo y estado reproductivo, y 2) una evaluación tomográfica de la calidad mecánica ósea referida a la fuerza (o área seccional) muscular regional, independiente del sexo. Sus intervalos fiduciales determinan escalas de z-scores para masa y calidad mecánica ósea

sobre ejes individuales verticales, posicionados en las abscisas según la masa y la fuerza o la sección muscular. Distinguimos así: a) osteopenias simples, sin compromiso biomecánico; b) osteopatías fragilizantes no-osteopénicas, y c) osteopatías fragilizantes osteopénicas («osteoporosis»). Esto aventaja al diagnóstico densitométrico por t-scores de masa ósea carentes de correlato biomecánico, que confunde osteopenias con osteoporosis.

## CARDIOVASCULAR II ISQUEMIA MIOCÁRDICA

### 101. Efectos del acondicionamiento (PC) sobre la aurícula (A) y ventrículo (V) provenientes de ratas alimentadas y ayunadas, expuestas a la hipoxia y la reoxigenación. G Testoni, M Carregal, S Cerruti, V Dalmon, P Kade, A Varela, E A Savino

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

Se investigó si el PC hipóxico mejora el funcionamiento del miocardio sometido a la hipoxia ( $N_2$  en vez de  $O_2$ ) y reoxigenación. Se montaron A izquierdas y bandas de V derecho estimulados a 1 Hz, en Krebs-bicarbonato con glucosa 10 mM. El PC consistió en un episodio de 5 min de hipoxia y 10 min de reoxigenación previos a la hipoxia sostenida que duró 60 min para las A y 30 min para los V. En A alimentadas el PC aceleró la recuperación de la fuerza desarrollada al reoxigenar ( $48.4 \pm 8$  vs  $27.7 \pm 3.9\%$  a los 2 min  $P < 0.05$ ). En A ayunadas el PC atenuó el desarrollo de contractura durante la hipoxia ( $16.87 \pm 5.6$  vs  $43.12 \pm 18.2\%$   $P < 0.01$ ) y mejoró la recuperación al reoxigenar 60 min ( $71 \pm 8.9$  vs  $49.8 \pm 7.9\%$   $P < 0.01$ ). En los V, ya sea ayunados o alimentados el PC no atenuó el desarrollo de contractura ( $19 \pm 6.5$  vs  $17.1 \pm 4.9\%$ ) ni mejoró la recuperación de la fuerza al reoxigenar ( $73.3 \pm 4.5$  vs  $72.8 \pm 11.4\%$ ). Se deduce que el PC es beneficioso para las aurículas de rata especialmente cuando son sometidas a ayuno previo y no mejora la función contráctil de los ventrículos en estas condiciones experimentales.

### 102. Participación de la PKC en los efectos durante la isquemia y la reperfusión del acondicionamiento isquémico. SM, Mosca, HE Cingolani

*Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Universidad Nacional de La Plata*

El «acondicionamiento isquémico» (PI) mejora la recuperación de la función sistólica postisquémica por activación de la proteínaquinasa C (PKC). El efecto del PI y PKC sobre la contractura isquémica (CI) se desconocen. Para ello, corazones de rata isovolúmicos fueron sometidos a 20 min de isquemia global (I) y 30 min de reperfusión (R) (A). El PI consistió en la aplicación de una I de 5 min y R de 10 min previos a la I de 20 min. El PI se repitió bloqueando la PKC con celeritrina (Ce = 25mg/min). La contractilidad fue evaluada a través de la presión desarrollada (PD) y la  $+dP/dt_{max}$  y CI por la presión diastólica final (PDF). Al final de la reperfusión la PD y la  $+dP/dt_{max}$  en A fueron  $61 \pm 6$  y  $61 \pm 5\%$  y después del PI fueron de  $90 \pm 5$  y  $94 \pm 6\%$ . Con Ce se abolió la mejora de la función sistólica. Al final de la isquemia la PDF fue de  $35 \pm 4$  mmHg en A, no se modificó después del PI, ni en presencia de Ce. Concluimos que: 1) el bloqueo de la activación de la PKC elimina la protección de la función sistólica brindada por el PI; 2) el PI no protegió de la contractura isquémica y 3) el bloqueo de la PKC tampoco alteró este parámetro. Estos datos sugieren que la contractura isquémica y la función miocárdica sistólica durante la reperfusión no son fenómenos interconectados.

### 103. Efecto de la Adenosina exógena sobre la función ventricular y las alteraciones vasculares del «Miocardio Atontado». M Donato, Celina Morales, Verónica D'Annunzio, O Scapin, RJ Gelpi

*Laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UBA; Grupo de Estudios Multicéntricos en Argentina (GEMA), Buenos Aires*

La disfunción ventricular postisquémica sistólica y diastólica («miocardio atontado») se acompaña también de alteraciones vasculares. Es conocido que la Adenosina (ADO) atenúa las alteraciones sistólicas. El objetivo del trabajo fue determinar si la ADO atenúa también las alteraciones diastólicas y vasculares del «miocardio atontado». Se utilizaron corazones aislados isovolúmicos de conejo, perfundidos a flujo coronario constante. En el Grupo 1 (G1) (n=21, control) se realizaron 15 min de isquemia (I) global seguidos por 30 min de reperfusión (R), y en el Grupo 2 (G2) (n=7) se repitió el protocolo del G1 pero agregando ADO (30 mg/Kg/min) al perfusato 10 min antes de la I y hasta el final de la R. Se midió la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PD, mmHg), la Presión Diastólica Final (rigidez diastólica) (PDF, mmHg), y la presión de perfusión coronaria (PP, mmHg).  $X \pm ES$ , \* $p < 0.05$  vs G1

	Control	5minR	30 min R
G1 PD	100.9±2.4	51.5±2.7	65.8±3.5
PDF	9.0± 0.5	19.6±2.0	34.4±2.5
PP	73.9± 2.0	65.9±2.5	85.1±2.4
G2 PD	101.5± 7.5	52.1±3.6	85.5±5.4*
PDF	10.5± 0.4	13.8±2.8	13.6±3.1*
PP	79.1± 3.8	56.8±5.0	63.9±5.6*

La ADO atenuó la disfunción postisquémica sistólica, el aumento de la rigidez diastólica y de la resistencia coronaria.

### 104. Efecto del Sevofluorano sobre la disfunción postisquémica sistólica y diastólica («Miocardio Atontado») en el corazón aislado de conejo. J Marini, M Donato, M Rodríguez, RJ Gelpi

*Laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UBA e Instituto de Cardiología, Corrientes*

Los anestésicos volátiles Halotano, Isoflurano y Enflurano protegen al miocardio de la disfunción postisquémica (Wartier y col. *Anesthesiology*, 69:552, 1988; White y col. *Br.J. Anaesth.* 73:214, 1994; Freedman y col. *Anesthesiology*, 62:29, 1985). El objetivo fue determinar el efecto del Sevofluorano (S), un anestésico de última generación, sobre el miocardio atontado. Se utilizaron corazones aislados isovolúmicos de conejo. En el grupo 1 (G1) (n=20, control) se realizaron 15 min de isquemia global seguidos por 30 min de reperfusión. En el grupo 2 (G2) (n=10) el protocolo fue semejante al grupo 1, pero se burbujeó el perfusato con S a una concentración del 2% y a un flujo de 2 l/min desde 10 min antes del periodo de isquemia, siendo este procedimiento discontinuado durante la reperfusión. Se midió la Presión Desarrollada (PD, mmHg), la Presión Diastólica Final (PDF, mmHg) (rigidez diastólica) y el tiempo de caída de la PD hasta un 50% de su valor ( $t_{1/2}$ , mseg) (relajación isovolúmica).

( $\bar{X} \pm ES$ )	Control	1min R	5min R	10min R	30min R
G1 PD	100.9±2.4	66.8±3.8	51.5±2.7	59.8±3.9	65.8±3.5
PDF	9.0± 0.5	14.3±1.7	19.6±2.0	22.0±2.2	34.4±2.5
$t_{1/2}$	51.2± 2.3	57.5±2.8	51.8±2.5	48.8±2.1	47.1±1.5
G2 PD	105.1±5.1	65.7±11.0	50.4±1.9	55.7±2.9	68.8±4.0
PDF	10.1±0.7	4.5±1.9	26.6±5.1	30.0±5.3	40.6±9.2
$t_{1/2}$	54.0±2.7	65.0±3.8	56.5±1.6	52.0±1.2	51.1±0.8

El Sevofluorano a diferencia de otros anestésicos volátiles no protege las alteraciones del miocardio atontado, en el corazón aislado e isovolúmico de conejo.

- 105. Efectos del acondicionamiento (PC) sobre la aurícula izquierda aislada de rata sometida a hipoxia en ausencia de sustrato exógeno.** G Testoni, M Carregal, S Cerruti, V Dalamon, P Kade, A Varela, EA Savino

*Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA y PROSIVAD-CONICET*

Se estudiaron los efectos del PC sobre la actividad contráctil de aurículas izquierdas de rata estimuladas a 1 Hz y sometidas a 45 min de hipoxia en Krebs-bicarbonato (gaseado con  $N_2$ ), sin glucosa (s/g) para agravar la injuria, seguidos de 60 min de reoxigenación con glucosa 10 mM (c/g). El PC de 5 min de hipoxia s/g seguido de 10 min de reoxigenación c/g previo a la hipoxia sostenida, no modificó la contractura ( $81.17 \pm 5.23$  vs  $75.17 \pm 11.91\%$ ) ni la recuperación de la fuerza al reoxigenar ( $47.17 \pm 7.12\%$  vs  $61.33 \pm 8.28$ ). Cuando el PC consistió en 5 min de hipoxia s/g con estimulación a 3 Hz seguidos de 10 min de reoxigenación c/g fue menor la fuerza desarrollada al reoxigenar 60 min ( $59.33 \pm 6.27$  vs  $75.17 \pm 5.28\%$   $P < 0.05$ ). Precondicionando con dos períodos de 5 min de hipoxia s/g seguidos de 10 min de reoxigenación c/g, se observó un mayor desarrollo de contractura ( $189.67 \pm 2.44$  vs  $119.67 \pm 3.08$   $P < 0.01$ ) y una menor recuperación al reoxigenar 60 min ( $40.6 \pm 4.1$  vs  $57 \pm 2.9\%$   $P < 0.05$ ). Los resultados indican que el acondicionamiento no preserva la función contráctil en aurículas aisladas de rata, sometidas a hipoxia en ausencia de sustrato exógeno.

- 106. Estudio del metabolismo energético en el corazón normal de conejo, durante la disfunción postisquémica y el acondicionamiento.** Ethel Feleder, Celina Morales, M Rodríguez, RJGelpi, Edda Adler.

*Instituto de Investigaciones Farmacológicas; Laboratorio Fisiopatología Cardiovascular Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires*

La disfunción postisquémica (DPI) («miocardio atontado») presenta en el corazón de rata una disminución en los niveles endógenos de nucleótidos que no es prevenida durante el acondicionamiento isquémico (PCI). El objetivo del trabajo fue evaluar el estado energético del corazón normal de conejo así como también durante la DPI y la protección por PCI. Se emplearon corazones aislados isovolúmicos de conejos. El grupo 1 (G1, n=4) de corazones normales sirvió de control. En el grupo 2 (G2, n=5) se indujeron 15 min de isquemia (I) seguidos por 30 min de perfusión (R). En el grupo de PCI (G3, n=8), el protocolo de G2 fue precedido por 5 min I y 5 min de R. Se evaluaron los contenidos endógenos de los nucleótidos de adenina: ATP, ADP y AMP en la cara anterior del ventrículo izquierdo en los grupos G1, G2 y G3. Los niveles de nucleótidos se midieron por HPLC con detección UV a 254 nm (fase reversa C-18). La homogeneidad de los picos se determinó con el detector por arreglo de diodos. El contenido endógeno de los nucleótidos (en  $\mu\text{mol/g}$ ) en G1 fue: ATP=  $1.382 \pm 0.409$ , ADP=  $1.433 \pm 0.432$  y AMP=  $2.972 \pm 0.639$ . Estos valores no se modificaron en el G2 (ATP=  $1.382 \pm 0.409$ , ADP=  $1.433 \pm 0.432$  y AMP=  $2.972 \pm 0.639$ ), ni en el G3 (ATP=  $1.743 \pm 0.492$ , ADP=  $1.346 \pm 0.368$ , AMP=  $3.306 \pm 0.867$ ). Se observó que el corazón normal de conejo presenta un alto contenido endógeno de AMP ( $p < 0.05$ ) con respecto a las concentraciones de ATP y ADP; y ésta relación no se modificó en G2 y G3. Se concluye que: 1) el corazón de conejo tiene características particulares en el metabolismo energético; y 2) a diferencia de otras especies, en el conejo la DPI presenta valores normales de nucleótidos endógenos que no se modifican durante el PCI.

## INMUNOLOGIA II INMUNOLOGIA CLINICA

- 107. La cirugía endoluminal de aneurisma de aorta abdominal (AAA) normaliza más rápidamente los niveles de IL-1ra**

**que la cirugía convencional.** M Ferreira, M Cecilia Fornari, Sandra A Espósito, RA Diez, JC Parodi.

*Instituto Cardiovascular Buenos Aires, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires*

El IL-1ra es un contrarregulador endógeno de la actividad proinflamatoria que contribuye a restaurar la homeostasis tras la injuria. Para evaluar el impacto proinflamatorio de las técnicas endoluminal y convencional de resección de AAA, estudiamos mediante ELISA (R&D Systems), prospectivamente, los niveles séricos (en pg/mL) de IL-1ra en 16 pacientes (13 varones, edad 55 a 75 años) sometidos a cirugía de endoluminal (n=12) o convencional (n=4). Pre-cirugía no existía diferencia ( $1178 \pm 126$  vs  $1052 \pm 240$ , ambos dentro del rango normal), aumentó post-cirugía (hasta 2713 y 3413 respectivamente, incrementos de 1535  $\pm$  341 y 2365  $\pm$  755,  $p = \text{NS}$  entre ellos), seguía elevada a las 24 h ( $p = \text{NS}$ ) pero a las 48 h el grupo endoluminal ya estaba mucho más cerca de su basal mientras el convencional seguía muy aumentando (1490 y 2891, incrementos de 312  $\pm$  221 vs 1739  $\pm$  836,  $p < 0,05$ ). A las 72 h, los niveles de IL-1ra eran todavía superiores al basal, sin diferencia entre ambos grupos (1498 y 1813, 320  $\pm$  147 vs 751  $\pm$  210 sobre el basal). Probablemente esta diferencia refleja la menor injuria de la técnica endoluminal.

- 108. Detección de apoptosis temprana y tardía en leucocitos sanguíneos de pacientes con infección por HIV-1.** M. Teresa Guereño, M Cecilia Fornari, M. Arantxa Goicoa, RA Diez.

*Laboratorio de Inmunofarmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires*

La inmunodeficiencia inducida por HIV-1 resulta de la depleción linfocítica por apoptosis. En este trabajo evaluamos apoptosis temprana y tardía en leucocitos de sangre periférica de pacientes infectados con HIV-1 en tratamiento (n=5, varones, CD4 entre 323 y 555  $\text{cél./mm}^3$ ). Se empleó detección simultánea de apoptosis temprana y tardía (Belloc *et al.* Cytometry 17:59, 1994), en base a captación de HOE 33342 e yoduro de propidio (IP, para marcar ADN). Se incubaron 100  $\mu\text{l}$  de sangre, a 37° durante 1 min. con HOE 33342 1 mg/mL y se transfirió a 4°C agregando 50  $\mu\text{g/mL}$  de IP. Los eritrocitos fueron lisados con FACS Lysing solution<sup>NR</sup>. Se adquirió de inmediato en un citómetro FACSort. Se definieron ventanas de FSS y SSC para PMN, linfocitos y monocitos. La mayoría de los linfocitos presentaba marcación con HOE 33342 (76,35  $\pm$  2,91% de las células), siendo mucho menor la fracción de PMN o monocitos (1,82  $\pm$  0,40% y 11,89  $\pm$  2,81 % respectivamente). La fracción con IP fue baja en todos los tipos celulares (7,11  $\pm$  1,06; 0,61  $\pm$  0,15 y 5,28  $\pm$  0,73%, en el mismo orden). Preliminarmente, estos datos sugieren que la fracción de linfocitos comprometidos en apoptosis es muy superior a lo previamente estimado.

- 109. Genotipificación del virus de Epstein Barr (EBV) aislado de líneas celulares obtenidas de cultivos de células mononucleares periféricas (PBMC) de pacientes hemofílicos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV).** P Baré, G Mendez, R Pérez Bianco, MM Bracco, B Ruibal Ares

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

Se obtuvieron líneas celulares de cultivos de PBMC de pacientes hemofílicos HIV positivos. Se genotipificó el EBV que provoca esta transformación como resultado de la expresión de sus genes de latencia. Se caracterizó por PCR el gen de la proteína EBNA 2 que distingue los dos tipos circulantes en la población (EBV-1, EBV-2) y además se estudió la existencia de una delección de 30 pares de bases en el gen de la proteína LMP1, identificada en linfomas de Hodgkin. Se estudiaron 21 líneas de pacientes HIV positivos y 6 dadores normales. Sólo una de las 21 líneas de hemofílicos resultó ser EBV-2 y 7 presentaron la delección mencionada en el gen

de la LMP 1. De la población control, 2 presentaron la delección, perteneciendo todos al EBV -1. Se plantea la necesidad de establecer la prevalencia del genotipo viral en población normal argentina para poder sacar conclusiones acerca de los datos obtenidos en nuestra población hemofílica estudiada

**110. La prolactina (PRL) humana disminuye el estallido respiratorio de neutrófilos (PMN) normales, medido por citometría de flujo.** M Cecilia Fomari, María E D'Alessandro, M Teresa Guereño, AD Intebi, RA Diez.

*Laboratorio de Inmunofarmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires*

Para determinar el efecto de la PRL sobre el estallido respiratorio de PMN normales mediante citometría de flujo (con citómetro FACSort, BD), empleando un equipo estandarizado (Burst-test, Orpegen Pharma, Alemania). El método se basa en la oxidación de rodamina 123 por los radicales generados durante el estallido. Se estudió sangre entera heparinizada de 11 sujetos normales, incubada 1 h a 37°C con 100 ng/mL PRL humana superpura (human PRL-SIAFP-B-2, NIDDK, NIH, EEUU). Se construyó una ventana para PMN en base a características morfológicas (FSC y SSC) y viabilidad (basada en contenido de ADN, medido con yoduro de propidio en FL2). Se evaluó el corrimiento de fluorescencia promedio en FL1. Sin estimulación no existía actividad ( $10 \pm 3$  UAF), similar con o sin PRL. El desafío con PMA ( $8 \mu\text{M}$ , 10 min.) indujo un significativo aumento ( $508 \pm 91$  UAF,  $p < 0,001$ ), el cual se inhibió por efecto de la prolactina ( $66 \pm 18$  UAF,  $p=0,002$  por ANOVA). Dado que esta concentración es encontrable en humanos, se requieren estudios adicionales con pacientes para determinar su relevancia clínica

**111. Utilidad de la detección conjunta de anticuerpos anti-GAD (GADA) y anti-ICA512 (ICA512AA) en el diagnóstico de diferentes formas de diabetes.** M Sica<sup>1</sup>, S Valdez<sup>1</sup>, V Labovsky<sup>1</sup>, A Krochik<sup>2</sup>, C Mazza C<sup>2</sup>, N Cédola<sup>3</sup>, E Poskus<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Cátedra de Inmunología, IDEHU, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, <sup>2</sup> Hospital Juan P. Garrahan, <sup>3</sup> UNLP

Nuestro objetivo fue evaluar la utilidad de la detección conjunta de GADA y ICA512AA en el diagnóstico de diferentes formas de diabetes. Ambos se detectaron individual y conjuntamente por radioinmunoprecipitación. Se detectó IAA por unión radioligando. Se estudiaron 71 pacientes diabéticos tipo 1 (DM1D) debutantes, 42 con DM tipo 2 requirientes de insulina antes de los 2 años del diagnóstico (DM1), 30 con DM tipo 2 que requirieron insulina luego de 10 años del diagnóstico (DM2I), 64 con DM tipo 2 (DM2) y 30 controles normales. Los resultados obtenidos fueron:

	IAA	ICA512AA	GADA	<sup>3</sup> 2 marc.	ninguno
DM1D	36.6%	66.3%	71.9%	60.6%	12%
DM1	29%	7.4%	38%	19.1%	47%
DM2I	10%	0%	11%	10%	89%
DM2	6%	0%	9%	1.6%	86%

La detección conjunta de GADA e ICA512AA junto con la de IAA es una herramienta útil en programas de predicción y prevención de las formas de diabetes infantil y de adultos jóvenes.

**112. Modulación de la reparación de quemaduras por inflamación y contrairritación.** JA Genovese<sup>1</sup>, Victoria de los Angeles Bustuoabad, R Meiss, P di Gianni y OD Bustuoabad  
*Área Bioingeniería, Laboratorios Craveri<sup>1</sup>; Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires*

La quemadura cutánea desencadena un fenómeno cicatrizal que se inicia con el depósito de fibrina, células, y mediadores

solubles (escara primaria, EP), y culmina con la epitelización sobre un lecho fibroso (escara secundaria, ES). El objetivo del trabajo fue demostrar que dichos fenómenos dependen de un equilibrio entre inflamación y contrairritación. Un área circular de 0.5mm, de piel del dorso, fue quemada bajo anestesia en tres grupos de ratones BALB/c: a) control; b) inflamación perilesional con turpentina; c) inflamación a distancia. Al día 14 9/9 ratones del grupo b mostraban caída de la EP contra 6/9 del grupo a y 2/9 del grupo c. La ES tuvo similar evolución. En otro experimento 24 ratones fueron quemados recibiendo 12 indometacina (0.001 mg/g). Estos últimos mostraron un retraso de la caída de ambas escaras (2/12 para la EP y 6/12 para la ES mientras en el control era 12/12, en los días 14 y 20). La exacerbación de la inflamación perilesional estimula la cicatrización, mientras que su reducción, por anti-inflamatorios, o por el incremento de la contrairritación por inflamación a distancia, la retarda.

## RIÑÓN I FISIOLOGIA RENAL

**113. Efecto de la glucosa sobre la captación de dopa en células tubulares renales aisladas.** Andrea Carranza, Marta Barontini, Ines Armando.

*CEDIE-CONICET, Hospital de Niños R. Gutierrez, Buenos Aires*

Hemos mostrado previamente que en un modelo de diabetes insulino-dependiente la excreción urinaria de dopamina (DA) está disminuida con respecto a la de su precursor, la dopa. El objetivo de este trabajo fue determinar, en células aisladas de tubulos contorneados proximales renales, el efecto de concentraciones crecientes de glucosa (Glu) en el medio sobre la captación de dopa y la síntesis de DA. Las concentraciones de dopa intracelulares y la producción de DA al medio fueron determinadas por HPLC-ED. En medios con Glu 3.4 mM la captación de l-dopa (100 nM-100 mM) fue dependiente de la concentración. La producción de DA al medio mostró una curva similar. El análisis de las curvas de saturación con dopa mostró dos sitios de transporte: uno de alta afinidad ( $V_{\text{max}} 1.20 \pm 0.2$  pmol/mg prot/min y  $K_m 320 \pm 21$  nM) y uno de baja afinidad ( $V_{\text{max}} 2.45 \pm 0.5$  pmol/mg prot/min y  $K_m 1530 \pm 300$  nM). El aumento de Glu en el medio inhibió la captación de dopa. A Glu 18.4 mM, la captación de dopa estaba disminuida 40%. El estudio del efecto de la Glu sobre el sitio de transporte de alta afinidad mostró una disminución en el  $V_{\text{max}}$  sin cambios en el  $K_m$ . Estos resultados sugieren que la disminución en la producción de DA en animales diabéticos es en parte atribuible a una disminución en la captación del precursor debida al aumento de la concentración luminal de Glu.

**114. Modificaciones de la presión arterial media (PAM) y la función renal por la administración simultánea de furosemida (F) y L-arginina (L-Arg) en la rata expandida.** Laura Bonofiglio, Angeles Costa, Marcela Marchetti, Ana Balaszczuk, Cristina Arranz.

*Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA; Fundación Barceló. PROSIVAD-CONICET, Buenos Aires*

El objetivo fue estudiar los cambios en los efectos de la F al administrarla con L-Arg en la expansión extracelular. Ratas anestesiadas expandidas (10% pc con NaCl 0.9%) tratadas con F (7,5mg/Kg) recibieron L-Arg (250mg/Kg) o L-NAME (1mg/Kg). Se midió: PAM (mmHg), Diuresis (D:ml/min/100g), Natriuresis (N: mEq/min/100g), Kaliuresis (K: mEq/min/100g). En los animales con sobrecarga salina la L-Arg aumenta la D ( $28.10 \pm 6.33$  vs  $44.26 \pm 8.45^*$ ) y N ( $3.72 \pm 0.70$  vs  $12.77 \pm 0.15^*$ ), respuesta que es revertida por la administración de L-NAME (D:  $13.14 \pm 1.98$ ; N:  $3.58 \pm 0.75$ ). En este modelo la acción diurética y natriurética de la F se modifica en presencia de L-Arg, evidenciándose un au-

mento de la D ( $107.26 \pm 8.73$  vs  $163.34 \pm 22.96^*$ ), sin cambios en la respuesta excretora de sodio y potasio inducida por la F. La sobrecarga salina no modifica la PAM ( $88 \pm 12$  vs  $102 \pm 2$ ). La L-Arg ( $73 \pm 6$ ) y la F ( $67 \pm 7$ ) la disminuyen significativamente. (\* $p < 0.01$ ). Conclusión: En la expansión extracelular, la acción diurética de la F se potencia con la administración de L-Arg, sin alterar el patrón de excreción de sodio y potasio

**115. Mecanismos de adaptación al metabolismo proteico de las nefronas remanentes en ratas con insuficiencia renal crónica (IRC).** Elsa Zotta, C Silberstein, P Fiorito, C Ibarra, N Yeyati.

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

El aumento de la excreción de urea por nefrona sería uno de los factores que inhiben la retroalimentación túbulo-glomerular determinando la hiperfiltración por nefrona observada en la IRC. El propósito de este estudio es conocer el manejo tubular de urea en el mecanismo de adaptación al metabolismo proteico en ratas con IRC. Se prepararon 3 grupos de ratas: control, con dieta hiperproteica y con IRC. Para inducir la IRC se utilizó el modelo del riñón con 5/6 de nefrectomía. Se observó que la urea plasmática en ratas con IRC aumentó significativamente con respecto a los controles ( $1,93 \pm 0,2$  g/l vs  $0,21 \pm 0,02$  g/l,  $n=4$ ,  $P < 0,01$ ), mientras que descendió en orina ( $17,19 \pm 1,54$  g/l vs  $26,84 \pm 8,7$  g/l,  $n=5$ ). La creatinina en plasma fue mayor en ratas con IRC que en controles ( $25,46 \pm 5,9$  mg/dl vs  $4,18 \pm 0,52$  mg/dl,  $n=5$ ) aunque no mostraron diferencias significativas en orina. Cuando se analizó la excreción fraccional de urea como la relación porcentual entre el clearance de urea y el de creatinina, se observó que en el grupo con IRC superaba el 100%. Este incremento de urea superior al de creatinina podría atribuirse a una secreción de urea a nivel tubular la cual sería responsable del mecanismo de adaptación observado en la IRC.

**116. Posible mecanismo de acople entre el balance glomerulotubular (BGT) y el feedback tubuloglomerular (FTG).** Paula Díaz Sylvester, M MacLaughlin, C Amorena.

*ININCA, Facultad de Medicina UBA y Escuela de Ciencia y Tecnología, UNSAM, Buenos Aires*

El endotelio de los capilares peritubulares modula vía óxido nítrico (NO) el proceso de acidificación proximal responsable del 60% de la reabsorción de Na, lo que forma parte del BGT. La tasa de filtrado glomerular oscila por cambios en el NaCl ofertado a mácula densa (FTG). Esto podría afectar la viscosidad ( $\eta$ ) de la sangre que sale por la arteriola aferente. Investigamos el rol de  $\eta$  y del NO como nexos entre el BGT y el FTG. En experimentos de micropunción con perfusión tubular proximal y peritubular simultánea, medimos la cinética de acidificación con microelectrodos de pH. El flujo de  $H^+$  es igual a  $J_H = (\kappa r/2)(\Delta B)$  donde  $\Delta B$  es la diferencia de base buffer a  $t=0$  y  $t=\infty$ ,  $\kappa$  es la constante de acidificación y  $r$  es el radio tubular. La  $\eta$  se modificó con dextran (D) y percoll (P) hasta 1.3 veces la  $\eta$  de la solución perfusora control (C).  $\kappa$  aumentó con el aumento de  $\eta$  y el efecto fue bloqueado por L-NAME. Los valores de  $\kappa$  fueron: C= $0.159 \pm 0.083$ ; D= $0.393 \pm 0.044$ ; P= $0.291 \pm 0.046$ ; D+L-NAME= $0.105 \pm 0.016$ . En curvas de acidificación sucesivas en un mismo túbulo  $\kappa$  osciló con una frecuencia en torno a 0.033 Hz. Estas variaciones estarían en fase con las oscilaciones en el filtrado debidas al FTG indicando que éste y el BGT podrían estar acoplados a través de un mecanismo que involucra cambios en  $\eta$  y en la liberación de NO.

**117. Regulación de la  $Na^+, K^+$ -ATPasa (NKA) en segmentos renales por fosfo-defosforilación por PKC y Calcineurina (CN).** FR Ibarra, SXJ Cheng, Anita Aperia, Astrid Lindgren

*Children's Hospital, Karolinska Institutet, Sweden; Instituto de Investigaciones Médicas A.Lanari, Universidad Nacional de Buenos Aires*

En este trabajo se estudia la regulación de la NKA por PKC y CN en segmentos microdisecados (SM) del nefrón. Se utilizó Western-blot de los SM, con McK1, un Ab que reconoce el sitio Ser23 defosforilado, que es el sitio para PKC en la isoforma alfa 1 de la NKA. Valores se expresan en unidades de densidad óptica (DO),  $X \pm ESM$ . En condiciones basales la DO del túbulo proximal (TP) fue menor que en el asa gruesa de Henle (AGH)  $2.99 \pm 0.61$  vs  $5.23 \pm 0.69$ ,  $p < 0.05$ . Al inhibir PKC con Ro 8220  $10^{-6}$  M en TP, la señal creció de  $2.55 \pm 0.71$  a  $3.58 \pm 0.7$   $p < 0.05$ . Lo mismo ocurrió al tratar al TP con oxymetazolina  $10^{-6}$  M (agonista alfa adrenérgico) la DO varió de  $3.3 \pm 0.84$  a  $7.5 \pm 0.5$   $p < 0.05$ . En el ensayo contra tiempo con oxy el pico mayor fue a los 15 min, decreciendo a los 20. El TP mostró un incremento de DO con concentraciones crecientes de  $Na^+$  intracelular. En cambio FK506  $10^{-8}$  M (inhibidor de CN) y Dopamina  $10^{-6}$  M disminuyeron más del 50% la DO en AGH sin afectar la banda en TP. DA  $10^{-6}$  M redujo la señal en 30% en TP con  $[Na^+]_i$  altas, 70 mM. El estado basal de fosfo-defosforilación de NKA difiere en TP y AGH. En TP predomina PKC y en AGH CN. El  $Na^+$  y las catecolaminas modifican fisiológicamente este equilibrio.

**118. Diferencia ligada al sexo en la depuración renal de ácido paraaminohiápico (PAH) en ratas de 365 días.** Jorgelina Cerruti\*, Adriana M Torres.

*Farmacología, Facultad Ciencias Bioquímicas y Farmacológicas, \*Facultad Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario*

Se ha descrito una diferencia ligada al sexo en la depuración de PAH en ratas Wistar adultas (120 días). El objetivo de este trabajo fue determinar si tales diferencias se observan en ratas de mayor edad. Se usaron ratas Wistar de 365 días machos (M) y hembras (H). Se prepararon para técnicas convencionales de clearance (M,  $n=5$ ; H,  $n=5$ ). Se determinaron: Velocidad de Filtración Glomerular (ml/min/g): M:  $1.28 \pm 0.19$ , H:  $1.05 \pm 0.19$ . Clearance renal de PAH (ml/min/g): M:  $4.64 \pm 0.43$ , H:  $3.37 \pm 0.27$ ,  $p < 0.05$ . Carga Filtrada y Secretada de PAH ( $\mu g/min/g$ ) [CFPAH: M:  $57 \pm 8$ , H:  $62 \pm 7$ ; CSPAH: M:  $173 \pm 23$ , H:  $108 \pm 11$ ,  $p < 0.05$ ]. No se observaron diferencias significativas en las excreciones de sodio, potasio y agua. Además, se realizó un estudio farmacocinético (M,  $n=5$ ; H,  $n=7$ ) luego de una inyección única de PAH (0.3 mg/kg p.c., i.v.). Algunos parámetros obtenidos fueron: Clearance sistémico de PAH (ml/min/100gr): M:  $2.74 \pm 0.21$ , H:  $2.74 \pm 0.07$ ; Constante eliminación ( $k$   $10 \text{ min}^{-1}$ ): M:  $0.35 \pm 0.02$ , H:  $0.31 \pm 0.02$ . Estos datos indicarían que en ratas de 365 días las hembras presentan una menor depuración renal de PAH debida a una disminución en la carga secretada del mismo. Tal diferencia no se observa en el clearance sistémico al contrario de lo descrito para ratas más jóvenes.

## TRANSPORTE

**119. Activación osmótica del intercambio  $Na^+/H^+$  en plaquetas humanas.** OA Gende.

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

Quando las células se exponen a soluciones hipertónicas se produce un rápido encogimiento seguido por la activación de mecanismos de regulación del volumen. En plaquetas sanguíneas cargadas con el indicador fluorescente BCECF se observó que el intercambiador de  $Na^+/H^+$  (NHE) es activado por el encogimiento osmótico. En solución salina hipertónica por agregado de 200 mmol/l de manitol, el cambio de pH intracelular luego de 500 segundos ( $\Delta pHi$ ) fue de  $0.10 \pm 0.01$ ; de  $-0.05 \pm 0.02$  en soluciones isotónicas y de  $-0.08 \pm 0.03$  cuando se inhibió el NHE ( $p > 0.05$ ). La eliminación del calcio no afectó la activación osmótica del intercambiador ( $\Delta pHi = 0.10 \pm 0.03$ ). La estimulación del NHE fue inhibida por preincubación con W7, un antagonista de calmodulina ( $\Delta pHi = -0.01 \pm 0.01$ ) y con ML7, un inhibidor de la quinasa de la cadena

liviana de miosina ( $\Delta\text{pHi} = 0.06 \pm 0.03$ ) mientras que con celeritina, un inhibidor de PKC, no se observan cambios significativos. Se concluye que la activación osmótica del NHE involucra una vía de fosforilación independiente de calcio.

**120. Evidencia del control neurogénico de los canales de calcio voltaje dependientes (CCVD).** S Muchnik, Adriana Losavio, Julieta Cassone, Haydeé Comar.

*Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Universidad Nacional de Buenos Aires*

El rol de los CCVD de tipo L y de tipo N sobre la liberación espontánea de neurotransmisor ha sido establecido en mamíferos adultos. El propósito del presente trabajo fue investigar este papel desde momentos precoces postnatales donde la innervación está recientemente establecida, hasta la adultez. Se estudió el efecto de la nitrendipina 5 mM, bloqueante de los CCVD tipo L sobre la frecuencia de los potenciales de placa miniatura (IMEPPs) en diafragma de ratones CF1 desde el día cuarto al día 40 post-natal (DPN). Los resultados mostraron que: 1- En los primeros DPN el potencial de membrana estaba disminuido (mV -56.7  $\pm$  3.4 (5) vs -66.7  $\pm$  4.1 (6),  $p < 0.008$ ), la duración de los MEPPs estaba prolongada (T50% ms: 12.4  $\pm$  2.93 (15) vs 4.53  $\pm$  1.09 (19) y la IMEPPs era un orden menor que los adultos (0.12/seg  $\pm$  0.04 (5) vs 1.55/seg  $\pm$  0.25(4),  $p < 0.001$ ); 2- Los efectos descriptos tienden a ser similares a los adultos controles luego del 15 DPN. 3- Durante los primeros DPN la nitrendipina redujo IMEPPs un 7.8  $\pm$  9.1 % (5), siendo ese efecto menor que el observado con la misma droga en ratones adultos (40 DPN, 35.1  $\pm$  2.9 % (4),  $p < 0.001$ ). Los cambios precoces observados en (1) están descriptos como reinerteratorios tempranos. El hecho que la magnitud de la población de CCVD tipo L siga un curso similar hacia la normalización como los demás parámetros, sugiere su dependencia de un control neurogénico, y/o la presencia de una población de CCVD resistentes a la nitrendipina, o la predominancia de otro tipo de CCVD.

**121. Permeabilidad al agua del recto de mamífero.** Arlinet Kierbel<sup>1</sup>, Claudia Capurro<sup>1</sup>, Monique Pisam<sup>2</sup>, S. Nielsen<sup>3</sup>, M. Parisi<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA; <sup>2</sup>Serv Biol Cell, CEA-Saclay, France; <sup>3</sup>Dept Cell Biol, Univ. Aarhus, Denmark.

El objetivo del trabajo fue determinar las bases funcionales, estructurales y moleculares de la permeabilidad al agua del epitelio rectal de mamífero. Se midieron simultáneamente, en el epitelio aislado del recto de conejo (n=8), los valores basales de flujo neto de agua ( $J_w$ , ml/min.cm<sup>2</sup>, +0.21  $\pm$  0.08); (en la rata -0.25  $\pm$  0.12), permeabilidad al <sup>14</sup>C-manitol (Ps, cm.s<sup>-1</sup>, 2.75  $\pm$  0.35.10<sup>-7</sup>), dif. de potencial (17.2  $\pm$  5.1 mV), corriente de cortocircuito (76  $\pm$  29 mA/cm<sup>2</sup>) y resistencia (141  $\pm$  22 W. cm<sup>2</sup>). Al aumentar la osmolaridad serosa se observó un aumento simultáneo y transitorio del  $J_w$  (+0.51  $\pm$  0.09) y de la Ps (+4.6  $\pm$  0.43.10<sup>-7</sup>). En una segunda fase se observó un aumento lento y HgCl<sub>2</sub> sensible del  $J_w$  mientras la Ps disminuyó. Estudios de criofractura y microscopía electrónica mostraron que, cinco minutos después del aumento de la osmolaridad serosa (pero no mucosa), las células epiteliales (tanto en rata como en conejo) aparecen marcadamente encogidas y los espacios intercelulares abiertos. Estos resultados sugirieron la presencia de canales para agua en las células epiteliales. La presencia de canales para agua en la membrana basolateral (acuaporina 3) fue demostrada por inmunohistoquímica en el epitelio rectal de la rata.

**122. Movimiento de agua y pH intracelular en células T84.** Roxana Toriano<sup>1</sup>, M A Ramirez<sup>2</sup>, G Malnic<sup>2</sup>, M Parisi<sup>1</sup>

*Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA (1) e Inst. Cien. Biomed. Universidad Sao Paulo, Brasil (2)*

**Objetivos:** Estudiar el acoplamiento agua-iones durante la secreción, en una línea celular (LC) derivada del colon humano. **Métodos:** la LC fue cultivada sobre soporte permeable y se midió

la corriente de corto circuito (CCC, mA.cm<sup>-2</sup>), el flujo neto de volumen ( $J_v$ , ul.min<sup>-1</sup>.cm<sup>-2</sup>) y el pH intracelular (emisión de fluorescencia a 495/440 nm tras incubación con BCECF). **Resultados:** Se observó un  $J_v$  espontáneo de secreción de -0.16  $\pm$  0.02 (n=12) y una CCC de 1.55  $\pm$  0.23 (n=8). El VIP (10<sup>-8</sup>M), una sustancia que eleva el AMPc intracelular, incrementó la CCC a 36.73  $\pm$  1.73 sin modificación del  $J_v$ . Por el contrario la bumetanida (10<sup>-5</sup>M), un inhibidor del cotransportador 2Cl<sup>-</sup>/Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, inhibió el  $J_v$  secretorio (-0.03  $\pm$  0.03) sin afectar la CCC. Finalmente la toxina termoestable de Escherichia coli (0.5 ug.ml<sup>-1</sup>) produjo un fuerte incremento de la CCC (18.85  $\pm$  4.31) y del  $J_v$  (-0.34  $\pm$  0.06). El pH intracelular control fue de 7.25  $\pm$  0.32, (n=21). Tras acidificación por pulso de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> la recuperación fue 100% Na<sup>+</sup> dependiente. **Conclusiones:** La secreción de H<sub>2</sub>O no está siempre asociada a un movimiento iónico electrogénico siendo posible un rol para los inter-cambiadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> y/o Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el acoplamiento agua-transporte iónico.

**123. Regulación hormonal del transporte asociado de agua e iones en una nueva línea celular de origen renal (RCCD1).** <sup>1</sup>V. Rivarola, <sup>2</sup>M. Blot-Chabaud, <sup>2</sup>N. Farman, <sup>1</sup>M. Parisi y <sup>1</sup>C. Capurro.

*Departamento de Fisiología, Facultad Medicina, UBA y <sup>2</sup>U246 INSERM, Francia.*

El objetivo de este estudio fue caracterizar la regulación hormonal por la AVP (Arginina-vasopresina) del transporte hidrosalino en una línea celular de túbulo colector cortical de rata (RCCD1). La medida del flujo neto de agua transepitelial ( $J_w$ , ml/min) se realizó en células cultivadas sobre soporte permeable, en paralelo con la medición de los parámetros eléctricos (Isc). Los resultados muestran que estas células presentan una secreción espontánea y mantenida a lo largo del tiempo (-0.725  $\pm$  0.098, n=13). El agregado de AVP (10<sup>-8</sup>M) induce, a "corto plazo" (20 min), una reducción significativa de la secreción basal (-0.09  $\pm$  0.076, n=7), asociada a un incremento en la corriente de corto-circuito ( $\Delta I_{sc}$ : 2.24  $\pm$  0.44 mA.cm<sup>2</sup>). Este efecto es bloqueado por el agregado de amiloride o DPC (inhibidores de canales de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>). De estos resultados concluimos que la AVP induce, a "corto plazo" un aumento de la reabsorción de agua acoplada a Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>. A "largo plazo" (7,5 hs) la AVP indujo un incremento en la síntesis *de novo* del canal de Na<sup>+</sup>, de la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/ATPasa y del CFTR, como muestran los estudios de inmunoprecipitación. Esto se tradujo en un incremento en la absorción de sodio y en la secreción de Cl<sup>-</sup>, en paralelo con un aumento significativo del  $J_w$  secretor (-1.180  $\pm$  0.092, n=11), sensible a glibenclamide (inhibidor del CFTR). Concluimos que la AVP regula diferencialmente el transporte de agua-iones a "corto y largo plazo".

**124. Corriente inducida por cafeína (CIC) en músculo esquelético de anfibio.** BA Kotsias, RA Venosa

*Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, UBA y Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Universidad Nacional de La Plata*

La activación del intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (INC) en músculo esquelético requiere un aumento de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (con 4 mM de cafeína, CAF). El INC es electrogénico (3 Na<sup>+</sup>: 1 Ca<sup>2+</sup>) en la mayoría de las células. De acuerdo a esto, en sartorio de rana con el INC en modo normal (Na<sup>+</sup>e / Ca<sup>2+</sup>i; corriente despolarizante), la despolarización con 50 mM de K<sup>+</sup> redujo el incremento en el flujo de Ca<sup>2+</sup> por CAF de 67  $\pm$  4 a 20  $\pm$  3 %. Ni<sup>2+</sup> (5mM) es un bloqueador de la corriente del INC. Contra lo esperado, Ni<sup>2+</sup> duplicó el flujo de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> CAF dependiente (p=0.002); CAF además aumentó el influjo de <sup>65</sup>Ni<sup>2+</sup> de 0.7  $\pm$  0.2 a 2.5  $\pm$  0.2 pMol.cm<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Se estudió la CIC en fibras cortas lumbricales de sapo (potencial de mantenimiento = -60 mV). Para ello, la movilidad de las fibras se redujo con 5 mM de 2,3 butanodione monoxime. Ni<sup>2+</sup> redujo la CIC de 4.13  $\pm$  0.48 (control) a 2.13  $\pm$  0.41  $\mu$ A.cm<sup>-2</sup>. El efecto fue similar al de 0 Na<sup>+</sup> o con amiloride 5 mM. Esto y las mediciones de flujos sugieren que en presencia de Ni<sup>2+</sup> el INC pasaría de un modo

electrogénico  $3 \text{ Na}^+ : 1 \text{ Ca}^{2+} + 1 \text{ Ni}^{2+} : 1 \text{ Ca}^{2+}$  (neutro). CAF también aumenta el flujo de  $\text{K}^+$  y el aumento de  $[\text{K}^+]_o$  en la cara externa del sarcolema se nota como una corriente despolarizante que correspondería a la fracción no inhibible de la CIC. Así, el incremento de  $[\text{K}^+]_o$  de 2.5 a 10 mM se expresó como una corriente hacia adentro de la fibra de  $0.57 \pm 0.42 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Conclusión: la despolarización por CAF se debería en parte a la corriente del INC y en parte, posiblemente a un aumento de  $[\text{K}^+]_o$  en contacto con la superficie externa del sarcolema.

### TUMORES III ONCOGENESIS VIRAL

125. **Polimorfismo de p53 en muestras de carcinomas de próstata de Buenos Aires y Chicago (U.S.A.)** GJ Leirós, Eiguchi Kumiko, Silvia Galliano, ME Sember, Elisabeth Schwarz, T Kahn

*Cátedra de Bioquímica e Inmunología, USAL, DKFZ, Heidelberg, Alemania*

La proteína codificada por el oncogen viral HPV E6 unida a p53 induce su degradación. Recientemente se ha demostrado una posible relación entre HPV de alto riesgo y el desarrollo de carcinomas de cervix asociado al alelo polimórfico p53-Arg y una probable resistencia con p53-Pro. Dada la incidencia de HPV en los carcinomas de próstata observada en nuestro laboratorio y con el objeto de estudiar el polimorfismo de p53 en estos tumores, se analizaron por PCR 47 muestras de ADN provenientes de tumores prostáticos: 29 de Buenos Aires (BsAs) y 18 de Chicago (Ch). Resultados: BsAs: 1 homocigota para el alelo p53-Pro, 4 para p53-Arg, 17 heterocigotas y 7 posiblemente han perdido ambas copias. Ch: 1 homocigota para p53-Pro, 10 p53-Arg y 7 heterocigotas. Estos resultados muestran una mayor frecuencia de homocigosis del alelo p53-Arg en las muestras de Ch ( $p > 0.0036$  test de Fisher con aproximación de Woolf). Las muestras HPV+ de Ch fueron homocigotas para alelo p53-Arg, mientras que en BsAs no hallamos esta asociación, lo que indicaría la importancia del bagaje genético en la configuración del riesgo carcinogénico.

126. **Estudios sobre origen celular y hormono-dependencia de tumores inducidos por nuevas variantes del virus de tumor mamario de ratón (MMTV).** Carolina Schere-Levy, Valeria Buggiano, Edith Kordon.

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

Hembras BALB/c infectadas con MMTVs recientemente descubiertos desarrollan tumores mamaros que crecen durante la preñez. Para caracterizar el comportamiento de los mismos, se realizaron pasajes en hembras vírgenes, la mitad de las cuales fueron cruzadas con machos. Los resultados muestran que algunos de los tumores tenían una marcada dependencia hormonal (HD). Por ejemplo, en una de las líneas tumorales, los 8 pasajes realizados en las hembras multíparas tuvieron una latencia de  $38,2 \pm 0,5$  días, mientras que en las vírgenes los tumores aparecieron en sólo 4 de los 6 pasajes realizados, con una latencia de  $71 \pm 11$  días ( $p = 0,001$ ). Pasajes de otros tumores presentaron un crecimiento hormono-independiente (HI). Los mismos aparecieron en todos los implantes (8/8), tanto en vírgenes como en multíparas, con latencias muy similares ( $31 \pm 1$  y  $32 \pm 3$  días). Por Southern blot observamos en una línea tumoral HD y otra HI, que todos los pasajes provenientes del mismo tumor primario poseen el mismo patrón de inserciones de MMTV, mostrando el origen clonal de los mismos. Además, en pasajes que han progresado de HD a HI, se observó la aparición de nuevas bandas sobre el patrón original. Estos resultados muestran que tanto tumores HD como HI pueden tener un origen clonal, y que la progresión hacia HI podría estar asociada a nuevas inserciones de MMTV en el genoma de las células tumorales HD.

127. **Análisis del gen BNLF-1 del virus de Epstein Barr en linfomas de Hodgkin pediátricos.** María V Preciado, E De Matteo, S Grinstein.

*Laboratorio de Virología, Hospital de Niños R. Gutiérrez, Buenos Aires*

LMP-1 es la única proteína del EBV considerada oncogénica, siendo su extremo C-terminal el responsable de su oncogenicidad. Se analizó la secuencia del extremo 3' del gen BNLF-1 que codifica para región C-terminal de la LMP-1, en 10 muestras de biopsias ganglionares de pacientes pediátricos (2-12 años, mediana: 6 años) con linfoma de Hodgkin que expresaban LMP-1 en células de Reed Sternberg y Hodgkin. En el 60% de las muestras analizadas (3/6 EBV-1 y 3/4 EBV-2) se encontró una delección de 30 pb entre la posición 168285 y 168256 del genoma del EBV, correlacionándose con un mayor n° de células tumorales. Estudios *in vitro* han demostrado que la presencia de ésta delección de 30 pb, prolonga la vida media de LMP-1 incrementando sus niveles de expresión; así el virus que expresa LMP-1 mutada tendría mayor potencial tumorigénico que aquel que expresa la LMP-1 *wild type*. Esto podría asociarse a un fenotipo clinicopatológico más agresivo.

128. **Detección de papilomavirus humano (HPV) en carcinomas prostáticos en pacientes de Buenos Aires.** GJ Leirós, Eiguchi Kumiko, Silvia Galliano, ME Sember, R Rubi, Elisabeth Schwarz, T Kahn

*Cátedra de Bioquímica e Inmunología, Universidad del Salvador, Buenos Aires; DKFZ, Heidelberg, Alemania*

Es conocido el papel del HPV en el desarrollo de cánceres ano-genitales, siendo los más frecuentes los tipos 18 y 16. Existe controversia en el papel del HPV en cáncer de próstata, ya que algunos autores lo han encontrado y otros no. Con el objeto de estudiar la existencia de infección HPV en carcinomas de próstata e hiperplasias de pacientes de Buenos Aires, se estudiaron por PCR y Southern el ADN obtenido de muestras que fueron incluidas en parafinas e histológicamente confirmadas, provenientes de 18 pacientes de edad  $>$  de 60 años: 10 carcinomas y 8 hiperplasias. El ADN fue obtenido por digestión de proteinasa K seguida de una extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol. Resultados: Todas las muestras derivadas de hiperplasias fueron negativas para HPV, mientras que 6 de los 10 carcinomas fueron positivos. Con los primers tipo-específicos dieron 2 HPV 16 (+) y 2 HPV 11(+). Usando los primers consensus fueron positivas otras 2, cuyo tipo se determinará, y todas las muestras de hiperplasias fueron negativas. Estos resultados sugieren que el HPV podría estar involucrado en la carcinogénesis de próstata.

129. **La muerte celular del epitelio secretorio mamario inducido por la expresión de TGF $\beta$ 1 no afecta la actividad tumorigénica del virus de tumor de mama murino (MMTV);** Carolina Schere-Levy, Valeria Buggiano, Edith Kordon.

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

Ratones hembras transgénicas FVB/N que expresan TGF $\beta$ 1 en el epitelio mamario durante la preñez, son incapaces de amamantar a sus crías debido a la apoptosis generada en este tejido. Este efecto se observa tanto en hembras homocigotas como hemicigotas. FVB/N transgénicos fueron cruzados con hembras BALB/c portadoras de tres nuevas variantes de MMTV con el objeto de estudiar si su actividad tumorigénica era afectada por la expresión de TGF $\beta$ . Se distinguió a las hembras transgénicas de las que no lo eran (controles) por su incapacidad de amamantar a sus crías. Durante sucesivas preñeces se estudió la incidencia y progresión tumoral de las hembras F1. No se observaron diferencias significativas en la incidencia tumoral en las hembras mayores de 5 meses: 10/17 en las transgénicas y 6/11 en las no transgénicas. Tampoco hubo diferencias significativas en la latencia de aparición de los tumores:  $4.1 \pm 0.1$  vs.  $4.3 \pm 0.2$  meses.

En ambos grupos la mayoría de los tumores fueron preñez dependientes (9/10 en las transgénicas y 5/6 en las no transgénicas, diferencias no significativas). Estos resultados muestran que las inserciones de los MMTVs exógenos que dan lugar al fenotipo transformado se producen muy tempranamente y anteceden a la actividad inhibitoria del TGFβ1; o bien que los blancos celulares de estas inserciones no son afectados por la actividad de TGFβ1.

**130. Asociación HLA-DR; HLA DQ en pacientes con cáncer de cuello uterino.** Kumiko Eiguchi, Cristina Carlin, Mónica Alvarez, GJ Leirós, María del Carmen Sanmaniego, T Kahn, S Grinstein.

*Bioquímica e Inmunología, USAL, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Inmunogenética- Mitre, Buenos Aires*

Se conoce el papel oncogénico del papilomavirus (HPV) en el cáncer de cuello uterino (CCU) y la variación de la incidencia según la etnogeografía, por lo que se fijó como objetivo estudiar si existe asociación HLA DR-DQ en pacientes con CCU y HPV. Se estudiaron 7 pacientes con CCU de las que se obtuvieron muestras del tumor y de sangre periférica con EDTA. Como grupo control (GC) se estudiaron 100 muestras de sangre de mujeres sanas y donadoras voluntarias mayores de 18 años. Se siguieron las recomendaciones éticas de Helsinki. El estudio de HPV se realizó por técnica de PCR tipo específico y consensus primers y el estudio de HLA DR, DQ por la técnica de PCR-SSP. Resultados: Las 7 pacientes fueron DR4, DQ3 (de las cuales 6 fueron DQ8 y una DQ7, ambos variantes del DQ3). La frecuencia del DR4 en el GC fue 27% ( $p < 0.0002$ , test de Fisher con aproximación de Woolf) y para DQ8 20% ( $p < 0.0033$ ) y DQ7 43%. Todas fueron positivas para HPV (HPV16: 5, HPV18: 1, HPV no identificado: 1). Los resultados muestran una probable asociación entre CCU y HLA DR4, DQ3. (*Subsidio Fundación Roemmers*)

#### ENDOCRINOLOGIA IV CITOQUINAS Y OXIDO NITRICO

**131. Efecto de la L-arginina en la modulación de la esteroidogénesis en zona fasciculata adrenal de rata.** C Cymeryng, Laura Dada, R Rosenstein, C Mendez, C Colonna, I Tamolunas, E. Podestá.

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

Resultados previos indican que el óxido nítrico (NO) producido por generadores externos ejerce un efecto inhibitorio en la esteroidogénesis adrenal basal y estimulada por ACTH. En el presente trabajo demostramos que el NO generado endógenamente a partir de L-arginina por la NO sintasa (NOS) ejerce un efecto inhibitorio sobre la biosíntesis de corticosterona (ng corticosterona/ $10^5$  cél: control:  $6.24 \pm 0.22$ ; L-Arg 2.5 mM:  $5.12 \pm 0.24$ ; ACTH:  $127.61 \pm 3.46$ ; ACTH + L-Arg:  $91.88 \pm 2.5$ ,  $n=4$ ). La actividad de NOS se demostró por el incremento en la producción de nitritos, producto del catabolismo del NO, y de GMPc, vía la activación de una guanilato ciclasa soluble. Se caracterizó además el mecanismo de captación de L-Arg por células de zona fasciculata determinándose un Km de 103 mM y una Vmax de 97 pmoles/min/ $10^5$  cél. L-ornitina, L-Lis, pero no D-Arg inhibieron la captación ( $35 \pm 2$ ,  $44 \pm 1$  y  $12 \pm 2$  respect.,  $n=3$ ) confirmando la estereoespecificidad del proceso de transporte. Un posible sitio de acción para el NO generado endógenamente sería a nivel del citocromo P450 scc, dado que el efecto inhibitorio de la L-Arg se observa cuando la esteroidogénesis es estimulada por 8Br-AMPC y 22R-OH colesterol pero no por pregnenolona. Los resultados sugieren la participación de una actividad endógena de NOS en la modulación de la esteroidogénesis adrenal.

**132. Caracterización de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) en zona fasciculata (ZF) adrenal.** Laura Dada, C Cymeryng, C Finkielstein, C Colonna, M Cornejo Maciel, E Podestá.

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

El objetivo de este trabajo fue investigar la presencia y caracterizar la actividad de la NOS en células de ZF adrenal. La actividad enzimática fue evaluada en células aisladas de ZF de adrenal de rata por la conversión de L-[ $^3$ H]arginina a L-[ $^3$ H]citrulina. La formación de L-[ $^3$ H]citrulina ( $0.45 \pm 0.06$  pmol/min/ $10^5$  células) fue dependiente de la presencia en el medio de reacción de NADPH, FAD,  $Ca^{2+}$  y tetrahidropterina siendo inhibida significativamente por trifluoperazina y los análogos de arginina, L-NAME y L-NNA (% inhibición:  $46 \pm 3$ ;  $80 \pm 4$ ;  $95 \pm 6$  respectivamente), inhibidores de la enzima. A partir de ARN total de ZF y de la línea de tumor adrenocortical Y1 de ratón se realizó un RT-PCR utilizando primers específicos para la amplificación de las isoformas NOS 3 (endotelial) y NOS 1 (neuronal). Estos primers amplifican fragmentos de 585 y 890 pb respectivamente. Sólo se amplificó una banda del tamaño esperado con los primers de la NOS 3. El fragmento amplificado a partir de ZF resultó un 93% homólogo con la NOS 3 de ratón. Immunoblots revelados con anti-NOS(3) indicaron la presencia de una banda de 150 kDa, tanto en zona fasciculata como en células Y1. Los resultados indican la presencia de una actividad de NOS en zona fasciculata de rata que posiblemente corresponda a la isoenzima NOS 3.

**133. Posible participación del óxido nítrico (NO) en la regulación funcional de la célula de Sertoli.** Silvina Meroni<sup>1</sup>, Angela Suburo<sup>2</sup>, Selva Cigorraga<sup>1</sup>.

*CEDE, Hospital de Niños R. Gutiérrez<sup>1</sup>; Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral<sup>2</sup>, Buenos Aires.*

El NO actúa como señal intra y extracelular en distintos tejidos. El objetivo de este trabajo fue estudiar la participación del NO en la regulación funcional de la célula de Sertoli. En cultivos de células de Sertoli provenientes de ratas de 20 días de edad se detectó la actividad de NADPH diaforasa, que indica la presencia de una o más isoenzimas de la NO sintasa (NOS). Los cultivos fueron estimulados por tres días con liberadores de NO [nitroprusiato de sodio (NP), 1mM y S-nitroso-N-acetil penicilamina (SNAP), 1mM]. Ambos tratamientos estimularon la actividad de g-glutamyltranspeptidasa ( $\gamma$ GTP) (B:  $19.2 \pm 2.1$ ; NP:  $34.0 \pm 1.4$ ; SNAP:  $39.2 \pm 4.1$ , pmol/ $\mu$ gDNA/min) y la producción de lactato (B:  $7.6 \pm 0.7$ ; NP:  $36.9 \pm 2.6$ ; SNAP:  $72.2 \pm 6.7$ ,  $\mu$ g/ $\mu$ gDNA) ( $X \pm DS$ ,  $n=3$ , \*  $p < 0,01$  vs B). La IL1 $\beta$  produjo los mismos efectos y además aumentó los niveles de nitritos en el medio de cultivo. Esta última acción de IL1 $\beta$  fue bloqueada por inhibidores de NOS (aminoguanidina, 1mM y L-NAME, 5mM). Se concluye que el NO podría participar en la regulación funcional de las células y que la IL1 $\beta$  podría utilizar este sistema de señales.

**134. Rol de NFκB y su interacción regulatoria con glucocorticoides en la apoptosis inducida por TNF-α.** Mónica A. Costas, Lionel Müller Igaz, Paola Plazas, Eduardo Arzt.

*Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires*

La acción antiinflamatoria de los glucocorticoides (GC) se explica a nivel molecular a través de una interacción física entre el receptor de GC y el factor de transcripción NF6B inducido por citoquinas (ej. TNF- $\alpha$ ), ó bien vía la inducción del factor inhibidor de NFκB, IκB, por GC. Hemos demostrado que los GC inhiben la apoptosis inducida por TNF- $\alpha$  en las células L-929. Sin embargo, en este modelo se desconoce el rol de NFκB. Se estudió el efecto de una disminución en los niveles de NFκB sobre la apoptosis inducida por TNF- $\alpha$  (2-100 ng/ml) en las células L-929 por: a) tratamiento con el inhibidor de la activación de NFκB, PDTC (1, 10, 100  $\mu$ M) y b) por transfección con un vector de expresión de IκB (mutante super-represor). PDTC 10-100  $\mu$ M resultó en un 100% de citotoxicidad en ausencia ó en presencia de TNF- $\alpha$ . Una dosis 1  $\mu$ M de PDTC al igual que la expresión del super-represor IκB, tuvo un efecto significativamente inhibitorio de la apoptosis

inducida por TNF- $\alpha$  ( $18 \pm 3$  y  $23 \pm 5$  % menor que TNF- $\alpha$  2 ng/ml, respectivamente). Se determinó además el efecto de dexametasona (Dex) 20 nM sobre la inducción de mRNA de I $\kappa$ B, en presencia ó en ausencia de TNF- $\alpha$  (2 ng/ml, 2 hs). Se observó una inducción de I $\kappa$ B en respuesta a TNF- $\alpha$ , Dex sola no tuvo efecto, pero en presencia de TNF- $\alpha$  produjo una disminución en los niveles del factor inhibidor. Estos resultados demuestran que en este modelo, NF $\kappa$ B tendría un rol protector en la apoptosis inducida por TNF- $\alpha$  y los GC ejercerían su acción antiapoptótica por un mecanismo que no involucra la disminución en los niveles de NF $\kappa$ B vía la inducción de I $\kappa$ B.

- 135. Expresión y función de receptores de citoquinas de la familia de IL-6/gp 130 en la hipófisis.** Carolina Perez Castro<sup>1</sup>, Alberto Carbia<sup>1</sup>, Florian Kuchenbauer<sup>2</sup>, Marcelo Paez Pereda<sup>2</sup>, Ulrich Renner<sup>2</sup>, Günter Stalla<sup>2</sup>, Eduardo Arzt<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, <sup>2</sup>Max Planck Institute, Munich, Alemania

Las citoquinas actúan como reguladores auto/paracrinos de la hipófisis a nivel de la secreción hormonal y la proliferación. En este contexto estudiamos el rol de la familia de citoquinas gp130 en la hipófisis, en particular el *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) y la interleuquina-11 (IL-11). Encontramos que las células lacto/somatotrofas GH3, poseen el receptor de CNTF (Northern Blot, 2 kb) y que el CNTF regula la secreción hormonal (RIA): 24 hs post-estimulación, basal vs CNTF 30 ng/ml: GH ng/ml:  $1027.4 \pm 29.1$  vs.  $1230.0 \pm 42.6$ ;  $p < 0.001$  y PRL ng/ml:  $502.6 \pm 45.52$  vs.  $728.37 \pm 71.03$ ;  $p < 0.05$ . Contrariamente estas células, no expresan el receptor de IL-11, el cual está presente en las células productoras de hormona, folículo-estrellada (TIT/GF) (Northern Blot, 1.8-2 kb). La IL-11 estimula la proliferación (ELISA para actividad de deshidrogenasas mitocondriales) de TIT/GF (24 hs post-estimulación-basal vs. IL-11 200 U/ml: 190%,  $p < 0.001$ ) e induce la secreción del *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (24 hs post-estimulación-basal vs. IL-11 200 U/ml; VEGF (pg/ml):  $88.49 \pm 2.3$  vs.  $288.28 \pm 23.9$ ;  $p < 0.05$ ). La IL-11 podría entonces mediar efectos paracrinos entre estas células y las células productoras de hormona. Reportamos por primera vez la presencia de receptores de dos miembros de la familia de citoquinas gp 130: CNTF-R e IL-11-R, que ejercen funciones regulatorias en distintos tipos celulares de la hipófisis

- 136. Regulación de la apoptosis durante el desarrollo folicular.** Fernanda Parborell, Marta Tesone.

Instituto de Biología y Medicina Experimental; Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto *in vitro* de un análogo de GnRH (LA) en folículos antrales tempranos (FT) y preovulatorios (FP) (ratas prepúberes tratadas con DES o eCG). Los folículos se incubaron en medio libre de suero en presencia de distintos estímulos y la apoptosis se determinó por extracción de DNA y corrida en geles de agarosa. En folículos antrales tempranos, LA (100 ng/ml) aumentó (30%) la apoptosis espontánea observada luego de 24 hs de cultivo, en cambio, la presencia de FSH (20-200ng/ml) o dAMPc (1mM) la disminuyó (75-85%). En ambos casos, el agregado de LA revirtió este efecto. Agregando factores de crecimiento al medio de cultivo, se observó que EGF, FGF e IGF-1 rescatan parcialmente a folículos antrales tempranos de la apoptosis (% de inhibición: 70, 35, 70 respectivamente), y la presencia de LA impide este efecto. En folículos preovulatorios sólo el EGF resultó inhibitorio (96%) de la apoptosis espontánea y el LA revierte este efecto. Asimismo, el LA per se aumenta el % de fragmentación del DNA (650%). En ningún caso LA (100 ng/ml) modifica la producción de progesterona (FT:  $C = 42.5 \pm 1.8$ , LA =  $46.31 \pm 0.81$ ; FP:  $C = 23.22 \pm 3.5$ , LA =  $23.75 \pm 5.4$ ). Se concluye que el LA ejerce un efecto sobre el ovario estimulando la apoptosis folicular, ya sea en forma directa o interfiriendo la acción de FSH o factores de crecimiento.

## GASTROENTEROLOGIA II ISQUEMIA Y PROTECCION HEPATICA

- 137. Las modificaciones de los niveles de óxido nítrico y lipoperoxidación, influyen en el proceso de regeneración hepática?** Cristina Carnovale, M Cristina Carrillo, Luján Álvarez, C Favre, J Monti

IFISE-CONICET, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario

**Objetivo:** Analizamos la posible influencia de lipoperoxidación (LPO) y óxido nítrico (NO) en el proceso de regeneración hepática. **Métodos:** Ratas Wistar machos adultas fueron divididas en 3 grupos: control(C) Sham(S) y hepatectomizado (HP 65%). 4 animales de cada grupo (n=12) recibieron aminoguanidina (AMG) (inhibidor de NO sintasa, NOS2) 100 mg/Kg PC i.p. cada 24h durante 3 días, otros 4 una dosis de lipopolisacárido (LPS) (activador de NOS2) 2 mg/Kg PC i.p. Las ratas fueron sacrificadas a las: 1, 3 y 5 hs luego de la cirugía S y hepatectomía. **Resultados:** El máximo aumento se observó a las 5 h después de la hepatectomía en LPO determinada como nmol de malondialdehído/100mg proteína microsomal (C:  $110 \pm 10$ ; S-5h:  $114 \pm 5$ ; HP-5h:  $154 \pm 15^*$ ) y determinada como la absorbancia de conjugados dienos microsomales a 233nm(C:  $860 \pm 20$ ; S-5h:  $877 \pm 15$ ; HP-5h:  $979 \pm 22^*$ ) y en NO (nmol de nitrato/mg de proteína citosólica) (C:  $8.90 \pm 1.2$ ; S-5h:  $8.5 \pm 1.5$ ; HP-5h:  $15.6 \pm 2.0^*$ ) ( $*p < 0.05$ ). El pretratamiento con AMG disminuyó estos aumentos, mientras que el LPS produjo en HP-5h un aumento del 31% en LPO y del 83% en NO respecto del C. La incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina al DNA (dpm/mg DNA), un índice de regeneración, en las ratas pretratadas con AMG, mostró una disminución del 30% en el pico observado normalmente a las 24h después de una HP (HP-24h-C:  $41250 \pm 3100$ ; HP-24h-AMG:  $28770 \pm 2785$ ;  $*p < 0.05$ ), no existiendo diferencias significativas en las ratas HP tratadas con LPS. **Conclusión:** La disminución en la producción de NO y por ende de LPO durante las primeras horas de la regeneración hepática producen una disminución en el proceso de regeneración.

- 138. Efecto inhibitorio del Interferon alfa-2b (IFN $\alpha$ -2b) sobre la regeneración hepática: ornitina decarboxilasa (ODC) y síntesis proteica.** C Favre, J Monti, Cristina Carnovale, M Cristina Carrillo.

IFISE-CONICET, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario

En este estudio analizamos la acción del IFN $\alpha$ -2b sobre la síntesis de proteínas en el hígado de ratas parcialmente hepatectomizadas y el nivel de la proteína ODC que participa en la síntesis de putrescina, poliamina esencial en el proceso regenerativo. **Métodos:** Ratas machos Wistar se dividieron en dos grupos sham (SH) y parcialmente hepatectomizados (HP); la mitad de cada grupo fue tratada con vehículo o IFN $\alpha$ -2b ( $2.5 \cdot 10^5$  U, i.p., 16 h antes y en el momento de la operación). A las 24 h de la cirugía se realizaron las siguientes determinaciones: síntesis hepática de DNA y de proteínas, concentración de putrescina hepática y detección de la proteína ODC en lisado total de hepatocitos. **Resultados:** IFN $\alpha$ -2b no modificó la síntesis de DNA durante la regeneración hepática, pero sí disminuyó significativamente la síntesis proteica, siendo la velocidad fraccional de síntesis  $12.1 \pm 1.7$  y  $7.0 \pm 2.0$  %/min en los grupos HP tratados con vehículo o IFN respectivamente. Los niveles de putrescina en estos grupos fueron:  $105 \pm 3$  y  $63 \pm 8$  nmol/g hígado respectivamente ( $p < 0.01$ ). La proteína ODC se halló significativamente disminuida en el grupo regenerante tratado con IFN $\alpha$ -2b respecto al grupo HP vehículo (densidades de banda:  $192 \pm 24$  y  $401 \pm 17$  unidades arbitrarias respectivamente). **Conclusiones:** El tratamiento con IFN $\alpha$ -2b disminuyó la síntesis proteica aún cuando no se observaron efectos sobre la síntesis de DNA. La disminución de ODC podría ser en parte responsable de estos resultados, al producirse niveles de putrescina que no logran mantener el pico de síntesis de proteínas tras la hepatectomía. Estos hallazgos pueden ser importan-

tes en la terapéutica ya que IFN $\alpha$ -2b es usado durante estados regenerativos, como ocurre luego del trasplante hepático en pacientes HCV.

**139. Eventos metabólicos y post-metabólicos en la protección por sillmarina (S) de la colestasis inducida por etinilestradiol (EE) en la rata.** MG Roma, EJ Sánchez Pozzi, CO Favre, JM Pellegrino, FA Crocenzi, Viviana A Catania, MG Luquita, AD Mottino, R Coleman.

*IFISE-CONICET Universidad Nacional de Rosario; Escuela de Bioquímica, Universidad de Birmingham, Inglaterra*

Se investigó si la S protege de la colestasis por EE (5 mg/Kg/día, s.c., 5 días) modificando su metabolización (oxidación y/o glucuronización) o, alternativamente, contrarestando los efectos deletéreos producidos por su metabolito glucuronizado, altamente colestásico. S (100 mg/Kg/día, i.p., 5 días) disminuyó en lugar de aumentar CYP3A4, la isoforma del citocromo P-450 responsable de la oxidación degradativa de EE, y pareció tener un efecto inhibitorio aditivo sobre la disminución inducida por EE (Control:  $3.0 \pm 0.4$ ; EE:  $1.6 \pm 0.2^*$ ; S:  $0.8 \pm 0.1^{**}$ , EE+S:  $0.5 \pm 0.2^{**}$  pmol/min(mg prot.)<sup>-1</sup>; \* $p < 0.05$  vs control, \*\* $p < 0.05$  vs EE). Por el contrario, la actividad EE UDP-glucuronosiltransferasa no registró cambios. El pretrata-miento de duplas aisladas de hepatocitos de rata con el componente activo de S, silibina (Sb, 2.5  $\mu$ M, 30 min), previno la inhibición inducida por estradiol 17 $\beta$ -glucuronido (E17 $\beta$ -G, 20  $\mu$ M, 15 min) en el % de duplas que transportaron a la vacuola canalicular el análogo de sal biliar fluorescente colil-lisil-fluoresceína (Control:  $73.3 \pm 1.9\%$ , E17 $\beta$ -G:  $42.9 \pm 2.2\%^*$ ; E17 $\beta$ -G+Sb:  $74.6 \pm 2.5\%^*$ ;  $p < 0.05$  vs control). Se concluye que S ejercería en parte sus efectos hepatoprotectores, a un nivel post-metabólico, previniendo las alteraciones ocasionadas por el metabolito glucuronizado de EE sobre el transporte de sales biliares canalicular.

**140. Secretina estimula la secreción biliar aumentando la inserción de canales de agua aquaporina-1 (AQP1) en membrana apical del colangiocito.** RA Marinelli, Pamela Tietz#, L Pham#, P Agre\*, NF LaRusso#.

*Instituto de Fisiología Experimental-CONICET-Universidad Nacional de Rosario; #Mayo Medical School, USA; \*Johns Hopkins Medical School, USA.*

En colangiocitos aislados, la secretina aumenta la permeabilidad de membrana al agua induciendo la inserción exocítica de AQP1 (Marinelli et al. JBC 272:12984. '97). En este trabajo se evaluó *in vivo* el rol de dicho proceso en la secreción biliar ductular estimulada por secretina. Se infundió i.v. secretina ( $10^{-7}$  M, 20 min) a ratas con proliferación ductular y seguidamente: (a) se aislaron los colangiocitos y se prepararon membranas plasmáticas, apical y basolateral. Se determinó AQP1 por inmunoblotting y densitometría y la actividad del marcador apical  $\gamma$ GT; (b) se realizó inmunohistoquímica para AQP1 en hígado. En otros experimentos, se inyectó inhibidor de microtúbulos colchicina (0.5  $\mu$ mol/100 g rata) 2 hs antes de la secretina. La secretina aumentó el flujo biliar ( $66.2 \pm 9.7$  vs  $119.3 \pm 8.7$   $\mu$ l/min/Kg  $p < 0.01$ , n:3) y APQ1 en membrana apical ( $1.5 \pm 0.1$  vs  $3.4 \pm 0.4$  U.A.  $p < 0.05$ , n:3) sin afectar la actividad  $\gamma$ GT apical ( $20.1 \pm 4.1$  vs  $21.9 \pm 2.0$  U/mg proteína) o la APQ1 basolateral ( $0.7 \pm 0.2$  vs  $1.0 \pm 0.2$  U.A.). Colchicina bloqueó los efectos de la secretina. La inmunohistoquímica confirmó la inserción apical de APQ1 inducida por secretina. *Conclusión:* la secretina induce *in vivo* la inserción dependiente de microtúbulos de APQ1 en membrana apical (polo secretorio del colangiocito), un proceso que cumpliría un rol central de bilis ductular.

**141. Prevención y reversión de la injuria mediada por Ca<sup>2+</sup> por el inhibidor de proteína-kinasa C (PKC) H-7 en duplas aisladas de hepatocitos de rata (DAHR).** MG Roma, J Ahmed-Chaudhury, R Coleman

*IFISE-CONICET, Universidad Nacional de Rosario; Escuela de Bioquímica, Universidad de Birmingham, Inglaterra*

Activación de PKC produce alteraciones morfo-funcionales en DAHR similares a aquellas inducidas por Ca<sup>2+</sup>. Dado que PKC es activada por Ca<sup>2+</sup>, investigamos si el inhibidor de PKC H-7 es capaz de contrarrestar estas últimas. Los agentes elevadores de Ca<sup>2+</sup> A23187 (0.16  $\mu$ M) y ATP (50  $\mu$ M) aumentaron el % de DAHR exhibiendo vesículas de membrana y redujeron el % de DAHR que acumularon en su vacuola canalicular la sal biliar fluorescente colil-lisil-fluoresceína (CLF, 2  $\mu$ M), así como el % de DAHR que retuvieron CLF una vez excretada. H-7 (100  $\mu$ M, 5 min) previno esos efectos. (Vesiculización: C:  $15 \pm 4$ , A23187:  $65 \pm 5\%^*$ , A23187+H-7:  $13 \pm 2$ , ATP:  $77 \pm 7\%^*$ , ATP+H-7:  $22 \pm 3\%$ ; Acumulación: C:  $69 \pm 3\%$ , A23187:  $37 \pm 3\%^*$ , A23187+H-7:  $71 \pm 3\%^*$ , ATP:  $35 \pm 2\%$ , ATP+H-7:  $70 \pm 4\%$ ; Retención: C:  $69 \pm 1\%$ , A23187:  $40 \pm 2\%^*$ , A23187+H-7:  $80 \pm 6\%$ , ATP:  $82 \pm 8\%$ ; \* $p < 0.001$  vs C). La elevación de Ca<sup>2+</sup> produjo una redistribución de actina (visualizada con faloidina-FITC) de la zona pericanalicular al cuerpo celular. H-7 no solo previno, sino que también revirtió parcialmente en 1 h la formación de vesículas y la reducción de la acumulación de CLF inducida por A23187 (Vesiculización: de  $88 \pm 6\%$  a  $49 \pm 4\%^*$ ; Acumulación: de  $16 \pm 5\%$  a  $49 \pm 3\%^*$ ;  $p < 0.005$ ). Se concluye que H-7 previene y revierte la injuria hepatocelular inducida por Ca<sup>2+</sup>, posiblemente bloqueando la activación de PKC mediada por este ión.

**142. Evaluación de la funcionalidad en cultivos primarios de hepatocitos obtenidos en aislamientos de baja viabilidad inicial.** Mariana Barbich, Alicia Lorenti, Patricia Sorroche, E Mullen, P Argibay

*Hospital Italiano de Buenos Aires.*

Tradicionalmente se requiere un gran número de hepatocitos viables y funcionales para sostener las funciones del hígado. Por ello los aislamientos marginales (baja viabilidad) son generalmente descartados. El objetivo de este trabajo fue cultivar *in vitro* durante un período de un mes células aisladas de hígados de ratas cuyas viabilidades iniciales no superaban el 55% y determinar su funcionalidad. Los hepatocitos fueron aislados con el método de doble perfusión y cultivados utilizando medio F10 suplementado con SFB (10%), EGF, transferrina, BPE, insulina e hidrocortisona. Desde el inicio se observó producción de albúmina con un valor máximo de  $1.28 \pm 0.07$   $\mu$ g/ml/día vs 0 del control, asimismo se determinó producción de urea basal con un pico de  $10.38 \pm 2.24$  mg %/día vs  $2.33 \pm 0.67$  del control. La actividad del citocromo P450 se determinó por MEGX con un pico de  $737 \pm 25$  ng/ml vs  $145 \pm 18.67$  del control. La histología mostró células viables a las 4 semanas. Estos resultados indican que, aunque el porcentaje de células viables no sea alto, estas son capaces de mantener funciones de síntesis y detoxificación.

### INMUNOLOGIA III

**143. Rol dual del AMP cíclico en la regulación de la apoptosis tímica inducida por glucocorticoides y el receptor T** Lionel Müller Igaz, Mónica Costas, Eduardo Arzt.

*Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires*

Tanto la activación vía el receptor T (TCR) como la exposición a glucocorticoides (GC) causan apoptosis en las células T de manera mutuamente antagónica. Hemos demostrado anteriormente en células Ti-6 que la adrenalina y análogos de cAMP potencian la acción de los GC, y actualmente corroborado ese efecto en otras dos líneas celulares de timoma de ratón (D0-11.10 y 2B4.11) utilizando CPT-cAMP, un análogo estable del cAMP. Dado que los factores modulados por la vía del cAMP podrían participar en la interacción con señales mediadas por el receptor de GC

activado, se analizaron por EMSA los cambios en los niveles de activación de los factores de transcripción que se unen a CRE (elementos respondedores a cAMP), en respuesta a CPTcAMP ó CPTcAMP + GC. Se observó la activación de diferentes proteínas pertenecientes a la familia CREB/CREM en respuesta a CPTcAMP, sin presentar diferencias en presencia ó ausencia de GC. También analizamos los efectos que ejercen las señales mediadas por la vía del cAMP sobre la inducción de apoptosis mediante activación del TCR (con anticuerpos anti-CD3). Los resultados obtenidos por los métodos de Naranja de Acrídina y citometría de flujo (anexina V) muestran que el análogo de cAMP antagoniza la acción pro-apoptótica del receptor T, con un % de mortalidad a las 16 hs de  $59.5 \pm 1.1$  con anti-CD3  $0.1 \mu\text{g}/2 \times 10^4$  cél. y  $21.8 \pm 6.3$  con CPTcAMP  $0,5 \text{ mM} + \text{anti-CD3}$  ( $p < 0.05$ ). Estos resultados muestran la participación de la vía del cAMP en la regulación de la apoptosis tímica, siendo su rol estimulador o inhibitorio dependiendo del estímulo (GC ó TCR).

**144. La actividad transcripcional ap-1 dependiente y la modulación del proto-oncogen bcl-2 están involucradas en la apoptosis mediada por galectina-1.** Gabriel Rabinovich<sup>1</sup>, C Alonso<sup>2</sup>, C Riera, C Sotomayor<sup>1</sup>

*Inmunología, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba; <sup>2</sup>Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de Buenos Aires*

RMGal es una galectina-1 purificada de macrófagos de rata capaz de inducir apoptosis de células T. Este efecto fue confirmado por ensayos de fragmentación del DNA genómico y ME. La cuantificación del nivel de apoptosis utilizando TUNEL por FACS reveló que la adición de RMGal a cultivos linfocitarios produjo un incremento de los niveles de incorporación de nucleótidos biotinilados de un 5% a un 33,4%, mientras que en presencia de lactosa el porcentaje de células TUNEL+ disminuyó a 11,8% confirmando la especificidad del efecto. Nosotros también evaluamos la actividad transcripcional dependiente de AP-1 en la apoptosis inducida por galectina-1, mediante geles de retardamiento. Extractos proteicos de cultivos linfocitarios incubados en presencia ó ausencia de galectina-1 fueron enfrentados a una sonda radioactiva conteniendo el sitio de unión AP-1. En los cultivos tratados con RMGal se generó una banda de retardo específica a los 30 min, la cual desapareció al introducir una sonda AP-1 no marcada y se restauró por el agregado de un competidor con una mutación en el sitio de unión a AP-1, rigurosos criterios de especificidad. La actividad transcripcional fue confirmada por el incremento de la expresión temprana de *c-jun* a través de ensayos de Northern blot. Ensayos Western blot revelaron una disminución de *bcl-2* en linfocitos expuestos por 6 h a la acción de RMGal. Por otro lado, el análisis de la secuencia reveló 37% de homología entre RMGal y *bcl-2* (55 de 92 aa). El presente estudio permite concluir que la apoptosis mediada por galectina-1, es un proceso fisiológico dependiente del dominio de carbohidratos, involucra actividad transcripcional AP-1 dependiente y se halla mediada por eventos asociados a *bcl-2*.

**145. Análisis inmunofenotípico de Sangre de Cordón.** F Quiroga, H Lejarraga, I Goldaracena, J Rossi, M Zelazko  
*Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan, Buenos Aires*

Dada la importancia del análisis de Sangre de Cordón (SC) en el diagnóstico precoz de inmunodeficiencias primarias y su uso creciente en trasplante alogeneico, es necesario conocer sus características fenotípicas y funcionales. Describimos las subpoblaciones linfocitarias y marcadores de activación e inmadurez en 39 muestras de SC y las comparamos con los valores obtenidos de 140 muestras de sangre periférica de niños normales utilizando técnicas standard de marcación de sangre entera; en el caso de CD40L, se activaron las células mononucleares 5Hs con PMA-I. En SC observamos un menor % de LB, LTgd y coexpresión HLA-DR/CD3 (SC Med=1.5%; niños Med=13.8%); un predominio

mayoritario de células naive CD4/CD45RA (SC Med=87.6%; niños Med=76.9%) y CD8/CD45RA (SC Med=93.3%; niños Med=89.8%) y una baja proporción del fenotipo de activación-memoria (CD4/CD45RO -SC Med=26.1%; niños Med=38.2- y CD8/CD45RO-SC Med=9.5%; niños Med=30.8%-). El % CD8/CD38 es alto en todos los grupos. En valores absolutos, SC presenta mayor N° de células T (CD4 y CD8) y NK, y menor N° de linfocitos B que el resto de los grupos pediátricos. Al comparar la expresión de CD40L en los grupos ya mencionados y un grupo de 20 adultos, observamos igual % de expresión pero menor intensidad en SC y niños, indicando menor densidad de moléculas por célula. Estas observaciones muestran la inmadurez y baja activación en SC.

**146. Diagnóstico definitivo de inmunodeficiencias primarias (IDP) combinadas y de anticuerpos ligadas al X.** S Danielian, G Basílico, J El Hakeh, M Oleastro, S Rosenzweig, M Zelazko

*Servicio de Inmunología, Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan, Buenos Aires*

La identificación y caracterización de los genes responsables de la inmunodeficiencia combinada severa ligada al X (X-SCID), del síndrome de hiper IgM (XHM) y de la agamaglobulinemia de Bruton (XLA) permiten analizar las bases moleculares de estas IDP. **Objetivo:** disponer de un método certero para el diagnóstico de estas IDP y ofrecer asesoramiento genético a las familias afectadas. **Materiales y Métodos:** se estudiaron 12 pacientes con XLA (7 familias), 1 paciente con X-SCID y 2 pacientes (2 familias) con XHM. Mediante el uso de oligonucleótidos intrónicos amplificamos por PCR cada uno de los exones del gen a estudiar, se analizaron los mismos por SSCP y se confirmó la presencia de mutaciones por secuenciación. **Resultados:** se identificaron mutaciones diferentes en todas las familias incluidas en el estudio (6 sustituciones puntuales, 2 deleciones, 1 compleja), de las cuales el 50% no han sido reportadas previamente en la literatura. De 17 mujeres estudiadas en estas familias, 10 fueron diagnosticadas como portadoras, pudiéndose además detectar como afectado a un varón asintomático, hermano de un paciente con XLA. **Conclusión:** mediante un eficiente análisis de mutaciones hemos establecido el diagnóstico molecular de estas IDP en nuestro país.

**147. Detección de alergenidad residual en sustitutos lácteos empleados en el tratamiento de la alergia a leche de vaca.** Docena G, Rozenfeld P, Fossati CA.

*Cátedra de Inmunología, Universidad Nacional de La Plata*

El tratamiento consiste en eliminar la exposición al alérgeno y reemplazarlo por otro alimento. El objetivo de este trabajo fue analizar la presencia de componentes alérgenos residuales en leches de otros orígenes (cabra, oveja, soja) e hidrolizados parciales y extensivos de leche bovina. Por SDS-PAGE, inmunoblotting e inmunoblotting de inhibición (empleando anticuerpos monoclonales específicos) se identificaron péptidos, caseínas y proteínas del suero. Por inmunoblotting y EAST se evaluó la alergenidad de estos componentes analizando la presencia de IgE específica en el suero de pacientes alérgicos a leche de vaca. Mediante ELISA de inhibición se detectó la presencia de componentes de leche y de reactividad cruzada en los productos analizados. Estos resultados indican que los hidrolizados extensivos de caseína contienen escaso poder alérgico en comparación con los otros sustitutos. Los hidrolizados de suero contienen restos de  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina, mientras que las leches de cabra y oveja muestran una marcada reactividad cruzada con proteínas de leche de vaca. Las leches de soja también revelaron componentes que cruzan con leche bovina. Por lo tanto, al momento de instaurar el tratamiento es importante identificar a qué alérgeno el paciente está sensibilizado y conocer la composición proteica y alérgica el sustituto a emplear.

- 148. Gen wasp: análisis de mutaciones en pacientes con síndrome de Wiskott-Aldrich (was).** S Danielian, J El Hakeh, G. Basílico, S Rosenzweig, M Oleastro, M Zelazko

*Servicio de Inmunología, Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan, Buenos Aires*

La caracterización del gen WASP hace posible la confirmación diagnóstica de WAS, inmunodeficiencia ligada al X de severidad clínica variable, a través del análisis molecular del mismo. **Objetivo:** describir las mutaciones del gen WASP en los pacientes de nuestra población y analizar la posible correlación fenotipo-genotipo. **Materiales y Métodos:** 13 pacientes (10 familias) fueron evaluados mediante análisis por SSCP de cada uno de los 12 exones del gen WASP, seguido de la secuenciación directa del exón alterado en SSCP. **Resultados:** se detectaron 8 mutaciones diferentes en 8 de las 10 familias, en las que pudimos además asesorar a 21 mujeres (16 portadoras y 5 no portadoras de WAS). Se observó una pobre correlación fenotipo-genotipo. **Conclusiones:** Este trabajo sienta las bases del análisis molecular de WAS en nuestro país con importantes implicancias en el diagnóstico precoz y el asesoramiento genético de las familias afectadas.

#### TUMORES IV HORMONODEPENDENCIA Y TUMORES

- 149. Caracterización de un nuevo tumor de mama murino espontáneo hormonodependiente (M05)** L Piudo, T Manzur, C Rey Moreno\*, C Garcia, S Klein

*Área de Investigación, Instituto de Oncología A. H. Roffo, Universidad Nacional de Buenos Aires. \*Área Patología Básica, Facultad Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires*

M05 es un adenocarcinoma semidiferenciado aparecido espontáneamente en una hembra virgen BALB/c. Crece solo en hembras, con una sobrevida de 120 días y 20% de incidencia metastásica en pulmón. Las células M05 producen GM-CSF y presentan receptores positivos para estrógeno y progesterona. Establecimos la influencia hormonogonadal del huésped sobre el desarrollo tumoral, ovariectomizando (OVX) ratones previo (a) y posterior (b) al trasplante del tumor. Se determinó: peso tumoral (P), parámetros hematológicos e histología. El P a los 65 días post-trasplante de (a) ( $0.95 \pm 0.18$  g) fue menor que el P del control (c) ( $3.27 \pm 0.37$  g)  $p = 0,017$ . La OVX postrasplante (b) detuvo el crecimiento tumoral, siendo el P al final de su evolución ( $1.63 \pm 0.31$  g) inferior a (c)  $p = 0,000$ . El grupo (c) presentó leucocitosis, a expensas de neutrófilos, en función del tamaño tumoral. En los tres grupos los adenocarcinomas M05 mostró patrones histopatológicos diferentes entre sí. El comportamiento del M05 es afectado por el estado hormonal del huésped, siendo un modelo tumoral interesante para el estudio de la hormonodependencia del tumor de mama.

- 150. Isoformas de Receptor a Progesterona en tumores mamarios murinos que tienden a la hormono independencia.** S Caruso, A Actis, V Dorfman, E Levin

*Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires*

En una presentación anterior determinamos que dos compuestos, MPA (acetato de medroxiprogesterona) y 8-CI-AMPC, que actúan sobre diferentes vías transduccionales, modificaban el equilibrio de isoformas de receptor a progesterona (RP) en tumores mamarios murinos hormono-dependientes a progesterona (C4-HD). En este trabajo usamos tumores de una sublínea tumoral, que tiende a la independencia hormonal (C4-t-l). El objetivo es establecer si el cambio en el grado de dependencia hormonal se expresa en el perfil de isoformas de RP, determinadas por HPLC de tamiz molecular. En controles sin tratamiento aparece una isoforma de 125 kDa (especie dimérica) y otra de 25 kDa que

puede corresponder al meroreceptor. En cambio, en la sublínea C4HD, se observaba un oligómero (>200 kDa) además del dímero. En la sublínea C4-t-l, el tratamiento con MPA y con MPA más 8-CI-AMPC no modifica el perfil de isoformas control. Con 8-CI-AMPC solamente, no se observa el pico de 125 kDa y aparece uno de 100 kDa, además del meroreceptor de 25 kDa. En la sublínea C4-HD, el 8-CI-AMPC no modificaba el perfil control. **Conclusión:** El pasaje a la hormono independencia en estos tumores murinos está asociado a cambios en el perfil de isoformas de RP y puede afectar el mensaje transcripcional.

- 151. Acción mitogénica de la heregulina en tumores mamarios murinos inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA).** ME Balañá, EH Charreau, PV Elizalde.

*Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires*

Se estudió la participación de la heregulina (HRG) en la proliferación de tumores inducidos por MPA. Resultados previos indicaron que existe una regulación positiva de la expresión de HRG por MPA en el tumor hormono-dependiente C4-HD. El tratamiento con HRG ?1 en concentraciones superiores a 2 ng/ml aumenta significativamente la proliferación de células epiteliales tumorales y es capaz de potenciar el efecto proliferativo del MPA a concentraciones de 20-200 ng/ml (cpm/incubación, C:  $403 \pm 45$ , 2 ng/ml; HRG :  $1042 \pm 205$ ; MPA:  $1653 \pm 159$ ; MPA +20 ng/ml HRG:  $2434 \pm 187$ ). Al tratar la células con oligodesoxinucleótidos antisentido (OA) del ARNm de HRG, produce una inhibición significativa ( $p < 0.001$ ) en la incorporación de  $^3$ H-timidina respecto de los controles creciendo con o sin MPA 10 nM. El agregado de HRG ?1 revierte el efecto inhibitorio observado en presencia de OA. El tratamiento con oligodesoxinucleótidos *scramble* (OS), en las mismas condiciones, no produce efecto sobre la proliferación celular (cpm/incubación, C:  $1094 \pm 120$ , MPA:  $1936 \pm 188$ , OA:  $528 \pm 23$ , OS :  $1082 \pm 28$ , OA+MPA:  $631 \pm 27$ , OS+ MPA:  $1745 \pm 33$ ). El tratamiento con OA produjo una disminución del 62% en la expresión de HRG respecto del control, mientras que no hubo cambios en presencia de OS. Postulamos que la HRG sería un mediador de los efectos proliferativos del MPA .

- 152. Citogenética de líneas celulares de carcinomas mamarios murinos inducidos por progestágenos.** Victoria Fabris, Claudia Lanari, Susana Merani.

*Instituto de Biología y Medicina Experimental; Centro de Investigación en Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires*

Se estudió la citogenética de 3 líneas celulares, dos de ellas originadas a partir de un mismo tumor hormono-dependiente, y otra a partir de un tumor hormono-independiente, ambos con receptores hormonales. Ambos adenocarcinomas se originaron en hembras BALB/c tratadas con acetato de medroxiprogesterona (MPA) y se mantienen por pasajes seriados en ratones tratados o no con MPA respectivamente. Se estudió el número cromosómico a partir de metafases obtenidas de cultivos con tratamiento citogenético convencional para técnicas de bandeo C y G. Las tres líneas resultaron ser poliploides, con número modal de 65 y 68 respectivamente para las derivadas de tumor HD y de 74 para la originada de tumor HI. Se observó además la presencia de marcadores, resultantes de fusiones Robertsonianas. Por medio de bandeo G se identificaron los cromosomas involucrados en dichas fusiones. En las tres líneas se observó como una constante la fusión de los cromosomas 1-y posiblemente 10 y 2 y posiblemente 17. Dos de las líneas presentaron solamente estos dos marcadores. La otra línea presentó las mismas fusiones pero repetidas de 2 a 4 veces. Además se observó la presencia de otros marcadores todavía sin identificar en esta última línea. La presencia de marcadores similares en las 3 líneas sugiere que estos eventos estarían relacionados con su origen etiológico común.

- 153. Isoformas del receptor de progesterona (RP), carcinomas mamarios murinos y hormono-dependencia.** Luisa

Helguero, Caroline Lamb, Leticia Labriola, Alfredo Molinolo, Claudia Lanari.

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

Disponemos de 3 líneas de carcinomas mamarios murinos progestágeno-dependientes (PD) y de 6 variantes progestágeno-independientes (PI), todas expresan altos niveles de receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP). Tres de las 6 líneas PI regresionan con antiprogéstágenos (AP) y otra 3 son AP resistentes. El objetivo del trabajo fue estudiar las isoformas del RP en relación con distintos grados de hormono-dependencia. Utilizando la técnica de western blot se caracterizaron las isoformas de al menos 3 tumores distintos de cada línea tumoral (tumores PD: crecidos en presencia o ausencia de MPA) útero y mama (control positivo) y músculo (control negativo). Los tumores PD y PI respondedores a AP mostraron una isoforma B 115 Kda y una A de 83 Kda más intensa, ambas en posición similar a los controles y una tercer banda de 78 Kda presente en 23 / 30 muestras. Se observó una regulación negativa de la expresión de las tres bandas, especialmente la de 78 Kda, en los tumores crecidos con MPA. Las 3 líneas AP resistentes mostraron una banda B débil ó ausente, una única banda en la posición de 78 Kda y ausencia de la A ( $p < 0.05$ ), con respecto a líneas PI sensibles a AP. Conclusiones: (a) Los carcinomas de mama estudiados presentaron una banda en la posición de 78 kda, ausente de los controles normales, la misma se está caracterizando; (b) la respuesta a antihormonas estaría asociada a la expresión diferencial de la isoforma A.

- 154. Acción de los antiprogéstágenos sobre la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular en un adenocarcinoma mamario murino.** MG Peters, E Charreau, P Elizalde, M Goín.

*Instituto de Biología y Medicina Experimental*

El objetivo del trabajo fue correlacionar el efecto inhibitorio del crecimiento tumoral de dos antiprogéstágenos de diferente mecanismo de acción, RU486 y ZK98299, con la expresión de moléculas reguladoras del ciclo celular: ciclinas D1, E y A, quinasas dependientes de ciclinas Cdk2 y Cdk4, y el inhibidor de Cdk5 p21 (WAF1). Se utilizó el adenocarcinoma mamario inducido por MPA C7H1, de histología ductal, progestágeno independiente, y que expresa receptores de estrógeno y progesterona. Dicho tumor sobreexpresa las ciclinas D1 y D3. Ratones hembra de la cepa BALB/c portadores del tumor (20-25mm<sup>2</sup>) se trataron diariamente con RU486 (5 mg/kg), ZK98299 (10 mg/kg), o permanecieron sin tratar. Se observó una disminución del crecimiento tumoral con ambos antagonistas (Tamaño tumoral, día 14: control: 80 ± 12mm<sup>2</sup>, RU486: 36 ± 19 mm<sup>2</sup>, ZK98299: 50 ± 16 mm<sup>2</sup>). Se prepararon extractos proteicos a partir de los tumores obtenidos luego de 1, 2, 3, 4, 7 y 14 días de tratamiento y de los tumores control, y se realizaron Western blots. A partir de las 24 hs de tratamiento se observó un aumento en la abundancia de p21, siendo máximo a los 4 días (3.3 veces) para retornar a los valores del control a los 7 días. No se observaron cambios en la expresión de las ciclinas D1 y E, ni en las Cdk2 y 4. Se detectó una significativa disminución de la expresión de la ciclina A en todos los tiempos estudiados. Los resultados sugieren la posible participación de p21 en la inhibición temprana de la proliferación tumoral inducida por RU486 y ZK98299.

## ENDOCRINOLOGIA V REGULACION Y FISILOGIA ENDOCRINA

- 155. Regulación de la función adrenocortical (AC) por la leptina (LEP) en ratones ayunados.** Andrés Giovambattista, A Chisari, E Spinedi.

*Unidad de Neuroendocrinología, IMBICE, La Plata*

El objetivo del estudio fue el determinar si existe un rol modulador de la LEP sobre la secreción, basal (VEH) y post insulina (INS), de corticosterona (B; en mg/dl). Se estudiaron tres grupos de ratones BALB/c, macho, ayunados durante 24 hs e inyectados (ip) con: I) VEH y sacrificados a los 45 min (VEH-t0); II) VEH, reinsertos en dieta normal, y sacrificados 45 min después (VEH-t45); y III) INS (0,3 UI/ratón), reinsertos en dieta normal, y sacrificados a los 45 min posteriores (INS-t45). Los resultados plasmáticos indican que los animales VEH-t45: a) incrementaron significativamente ( $p < 0,05$ ) la glucosa (en g/l) de  $0,95 \pm 0,05$  (VEH-t0) a  $1,42 \pm 0,03$ ; b) disminuyeron en forma significativa ( $p < 0,05$ ) la B de  $7,7 \pm 0,03$  (VEH-t0) a  $4,9 \pm 0,9$ ; y c) aumentaron significativamente ( $p < 0,05$ ) la LEP (en ng/ml) de  $2,19 \pm 0,36$  (VEH-t0) a  $4,02 \pm 0,39$ . Los ratones del grupo INS-t45 mostraron: 1) una significativa hipoglucemia ( $0,68 \pm 0,04$ ;  $p < 0,05$  vs. VEH-t0 y VEH-t45); 2) niveles de B ( $4,61 \pm 0,80$ ) significativamente ( $p < 0,05$ ) menores que los VEH-t0 pero no que los VEH-t45; y 3) una concentración de LEP ( $4,06 \pm 0,93$ ) semejante a la del VEH-t45 y significativamente ( $P < 0,05$ ) mayor que la del VEH-t0. Este estudio sugiere un posible rol inhibitorio de la LEP sobre la actividad AC, independiente de la glucemia.

- 156. Inhibición de la ACAT (Acil CoA Colesterol Acil Transferasa) y esteroidogénesis en células de Leydig MA-10.** OP Pignataro

*Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires*

El colesterol (Col) es un precursor indispensable para la síntesis de esteroides y puede provenir de las lipoproteínas plasmáticas, de la síntesis *de novo* o de depósitos de ésteres de col (CE). Se estudió el efecto de la inhibición de la ACAT, enzima responsable de la esterificación del col libre, sobre la esteroidogénesis en células MA-10. Se utilizó el inhibidor específico 58-035 (Ai) (Sandoz Argentina) en una concentración de 2 mg/ml. Las células se incubaron con distintos factores en ausencia o presencia de Ai y se determinó la incorporación de <sup>3</sup>H-ácido oleico a CE, la concentración celular de CE y la progesterona (Pg) producida. **Resultados:** Curvas dosis-respuesta para la producción de Pg en presencia de hCG o db-AMPC, mostraron una disminución de la ED<sub>50</sub> en presencia de Ai, con respuestas máximas similares. Una dosis máxima de EGF, que provoca un aumento de Pg, mostró un efecto sinérgico en presencia de Ai (C:  $2.5 \pm 0.1$ , EGF:  $12.1 \pm 0.3$ ; Ai:  $5.4 \pm 0.4$ ; EGF + Ai:  $88.0 \pm 3.0$  ng Pg/10<sup>6</sup> cel). **Conclusiones:** a) En las células de Leydig MA-10, la inhibición de la ACAT aumenta la disponibilidad de col libre e incrementa la síntesis de esteroides. b) El EGF, de la misma manera que la gonadotropina, regularía el paso limitante de la esteroidogénesis, favoreciendo la entrada del col citoplasmático a la mitocondria.

- 157. Envejecimiento y respuesta gonadotrófica al N-metil-D-aspartato (NMDA) y a la luteoliberina (LHRH) en la rata hembra P Arias, Alejandra Valerani, JA Moguilevsky**

*Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA*

A fin de evaluar la participación de mecanismos hipotalámicos e hipofisarios en los cambios de la función reproductora asociados al envejecimiento, estudiamos, en ratas Wistar hembra de 6 (JOV), 12 (MED) y 18 meses (VIE) de edad (ovariectomizadas + 100 mg/kg de benzoato de estradiol) la liberación de LH (medida por RIA): a) *in vivo*, tras 15, 30 y 45 mg/kg de NMDA i.v.; b) *in vitro*, en hemihipótesis incubadas con LHRH (1, 10 y 100 nM). Los niveles séricos basales de LH fueron significativamente mayores ( $p < 0.05$ , ANOVA) en ratas JOV vs VIE. En ratas JOV, el NMDA (30 y 45 mg/kg) incrementó significativamente ( $p < 0.05$ ) la LH circulante; este efecto se observó en ratas MED únicamente tras 45 mg/kg. Ninguna de las dosis administradas provocó una elevación significativa de este parámetro en ratas VIE. *In vitro*, no se observaron diferencias significativas entre los grupos JOV y MED en cuanto a la liberación de LH estimulada por LHRH. En el grupo VIE se demostró una respuesta reducida ( $p < 0.05$  vs JOV) a LHRH 1 nM. Concluimos que el acontecimiento del ciclo estral,

acompañado de anovulación, que están presentes en ratas a partir de los 12-14 meses de edad, se debería a un mecanismo hipotalámico (insuficiente respuesta a glutamato); las ratas de 18 meses de edad presentan una respuesta hipotalámica aún más deteriorada, y una afectación del gonadotropo (quizás secundaria al déficit crónico de LHRH, producto de las alteraciones hipotalámicas).

**158. Dilucidando los mecanismos inhibitorios del alcohol sobre la secreción de LHRH** A Lomniczi, C Mastronardi, A Faletti, <sup>a</sup>A De Laurentiis, <sup>a</sup>A Seilicovich, <sup>b</sup>SM McCann, V Rettori

(CEFYBO-CONICET)-<sup>a</sup>(CIR-UBA)-<sup>b</sup>(LSU-USA)

En estudios previos demostramos que el alcohol (EtOH) inhibe la secreción estimulada de la hormona liberadora de gonadotropinas (LHRH), de hipotálamos medios basales (HMB's) de rata macho adulta incubados in vitro. Se estudió la participación de los sistemas opioide y GABAérgico en esta inhibición. Los experimentos se realizaron con HMB incubados in vitro en Krebs-Ringer-Bicarbonato a 37°C con carbógeno. Se midió la liberación de LHRH y b-Endorfina (b-End) por RIA, y GABA por ensayo de radio receptor. EtOH (100mM) aumentó la liberación de  $\beta$ -End (C:  $2 \pm 0,098$  ng/HMB; EtOH:  $3,5 \pm 0,32$ ; n=6-8; p<0,001) y GABA (C:  $0,286 \pm 0,027$  nmoles/mg prot; EtOH:  $0,484 \pm 0,057$ ; n=7; p<0,05). b-End aumentó la secreción de GABA ( $0,461 \pm 0,09$ ) (n=6; p<0,05) y GABA no afectó la de  $\beta$ -End. La secreción de LHRH (C:  $5,08 \pm 0,28$  pg/HMB; n=13) estimulada por nitroprusiato de sodio (600mM) ( $8,6 \pm 0,77$ ; n=9; p<0,001) fue inhibida tanto por  $\beta$ -End ( $10^{-6}$ M) ( $6 \pm 0,42$ ; n=10; p<0,05) como por EtOH ( $5,05 \pm 0,62$ ; n=9; p<0,001), esta inhibición no se revirtió con naltrexona ni bicuculina. Estos resultados indican que aunque el EtOH estimula GABA y b-End, inhibidores de LHRH, a su vez inhibe directamente la secreción de LHRH.

**159. Rol de la FSH y la testosterona en el desarrollo espermatogénico en humanos.** Ana Keselman, Stella Campo, C. Bergadá, H. Chemes

CEDIE, Hospital de Niños R. Gutierrez, Buenos Aires

La Hiperplasia Suprarrenal Congénita Virilizante (HSCV) es una enfermedad familiar con pseudo-pubertad precoz en varones. Un paciente de 23 años consultó por esterilidad con azoospermia, talla baja, y testículos pequeños. Había comenzado su pubertad a los 5 años, y por tener un hermano de 5 años con HSCV se realizaron estudios que confirmaron este diagnóstico. La biopsia testicular mostró inmadurez espermatogénica. Se inició tratamiento corticosteroide, y se siguieron las variables a los 0, 2, 4, 5, 7 y 9 meses post tratamiento: 17OH Progesterona (17OHP<sub>2</sub> ng/ml) 170, 0,8, 0,7, 6, 1,2, 3,1; Testosterona (T) plasmática (ng/dl) 1830, 75, 105, 178, 148, 220; Volumen testicular (VT, ml, der/izq) 5/6, 6/8, 10/12, 10/12, 12/12; espermatozoides ( $10^6$ /ml) 0, 0, <0,1, <0,5, 0,9, 1,4), FSH (basal mU/ml) 1,0, 4,8, ND, ND, 5,0, 5,4. Luego de la caída inicial de la 17OHP<sub>2</sub> y la T de origen adrenal, hubo un sostenido aumento de la T de origen testicular y la FSH, con desarrollo testicular y producción de espermatozoides. La inhibina B aumentó de 180 pg/ml (infantil) a 440 pg/ml (puberal). El incremento de la inhibina B, el VT y los espermatozoides coincidió con el progresivo aumento de la FSH y T, sugiriendo que la combinación FSH-T es necesaria para la maduración Sertoliana y desarrollo espermatogénico en humanos.

**160. Una fosfoproteína regulada por hormonas intermediaria en la liberación de ácido araquidónico es 100% homóloga a una acil-CoA tioesterasa.** CV Finkielstein, PM Maloberti, P.G Mele, EJ Podestá

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

Previamente demostramos la secuenciación parcial de una fosfoproteína ACTH dependiente (p43) que regula la síntesis de

esteroides a través de la liberación de ácido araquidónico (AA). En el presente trabajo mostramos que la misma resultó ser 92% y 100% homóloga a dos acil-CoA tioesterasas (citoplásmica y mitocondrial respectivamente) de hígado de rata, ambas inducibles por proliferadores de peroxisomas y recientemente ingresadas al GeneBank. La proteína muestra un motivo de serina lipasa y un motivo G-X-H cercano al carboxilo terminal que es necesario para su actividad enzimática. En la región amino terminal se encuentra una cisteína que podría estar involucrada en el sitio activo de la tioesterasa. Anticuerpos dirigidos contra el motivo serina lipasa (ASL) y la región amino terminal (ARA) inhiben la actividad esteroidogénica ( $113,0 \pm 10,0$  vs  $51,1 \pm 6,3$  vs  $25,0 \pm 3,2$ ; media  $\pm$  DS, % del control para suero normal, ASL y ARA respectivamente; n=4, \*p<0,01; \*\*p<0,001). Dado el papel obligatorio de esta proteína en la síntesis de esteroides a través de la liberación de AA proponemos el nombre de ARTIST (Arachidonic acid Related Thioesterase Involved in Steroidogenesis). Estos resultados postulan una nueva vía de regulación de la liberación de AA en el mecanismo de transducción de señales a través de la activación de receptores de membrana.

**161. Activación de una tioesterasa específica para ácidos grasos de cadena larga en corazones perfundidos con agonistas adrenérgicos.** Isabel Neuman, Constanza Lisdero, P Mele, Paula Maloberti, JJ Poderoso, EJ Podestá

Departamento de Bioquímica y Laboratorio del Oxígeno, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Previamente hemos comprobado que el citosol de corazón perfundido con el agonista beta adrenérgico isoproterenol (ISOP) ( $10^{-7}$  M) es capaz de estimular la síntesis mitocondrial de esteroides adrenales. En este trabajo se investigó la presencia de una proteína liberadora de ácido araquidónico (AA) en citosol cardíaco. El efecto del citosol perfundido con ISOP es dosis dependiente e inhibible por propranolol (ISOP:  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  M;  $90 \pm 15$ ,  $930 \pm 87$ ,  $1280 \pm 124$ ,  $1650 \pm 145$  pg de progesterona/incubación respectivamente; n=4). Por otra parte no es inhibido por inhibidores de la proteína quinasa AMPc- dependiente. Anticuerpos anti péptidos dirigidos contra los sitios activos (entre ellos un motivo de serina lipasa) de la proteína ARTIST (arachidonic acid related thioesterase involved in steroidogenesis) descrita por nuestro laboratorio bloquean la actividad del citosol. Más aún, inhibidores de la liberación y metabolización de AA bloquean la actividad en citosol. Esta actividad citosólica también es observada con el agonista alfa adrenérgico fenilefrina. Los resultados sugieren la presencia de ARTIST en corazón, regulable por agonistas alfa y beta adrenérgicos. Se muestran por primera vez evidencias de un mecanismo alternativo para la liberación de ácido araquidónico en tejido cardíaco.

## METABOLISMO

**162. Relación entre susceptibilidad a la oxidación *in vitro* (SOx) de HDL y su efecto sobre la oxidabilidad de LDL.** Silvia Sanguinetti, V Fasulo, F Brites, R Wikinski, L Schreier

Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

En trabajos anteriores demostramos que HDL protege a LDL frente a la oxidación *in vitro* con Cu<sup>2+</sup>. Las HDL más oxidables podrían ser menos eficientes en su función protectora. Nuestro objetivo fue estudiar la relación entre SOx de HDL y su capacidad de inhibir la oxidación de LDL (Inhib %), proveniente del mismo plasma. Se aisló LDL y HDL de plasma de 18 donantes por ultracentrifugación secuencial (d=1.019-1.063 g/ml y d=1.063-1.210 g/ml) respectivamente. Se incubaron: 1. HDL (20 mg proteína/dl); 2. LDL (10 mg/dl) y 3. HDL + LDL (20+10 mg/dl), con Cu<sup>2+</sup> 10 mM, durante 2h, a 37°C. Se midieron Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) en los 3 grupos. En 3. se descontó TBARS

de HDL. TBARS expresados en nmol malondialdehído/mg proteína (Media  $\pm$  ES, n=18) fue:  $45 \pm 3.5$ ,  $81 \pm 9.3$  y  $51 \pm 7.5$  en 1., 2. y 3., respectivamente. La Inhib % fue de  $36.4 \pm 5.55\%$ . TBARS-HDL correlacionó negativamente con Inhib % ( $r = -0.49$ ,  $p < 0.05$ ). Se concluye que cuanto mayor es la oxidabilidad de HDL menor es su capacidad de inhibir la oxidación de LDL.

**163. Reacciones oxidativas del óxido nítrico en la mitocondria.** FJ Schöpfer, CL Lisdero, MC Carreras, NA Riobó, P Finocchietto, A Boveris y JJ Poderoso

*Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno y Cátedra de Físicoquímica, Universidad de Buenos Aires*

El óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ) aumenta la producción de anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) y de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en las mitocondrias. La secuencia de reacciones sería: [1]  $\bullet\text{NO} + \text{QH}_2 \rightarrow \text{Q}\bullet + \text{NO}^-$ , [2]  $\text{Q}\bullet + \text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2^{\bullet-} + \text{Q}$ , [3]  $\text{O}_2^{\bullet-} + \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ , and [4]  $\bullet\text{NO} + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{ONOO}^-$  (peroxinitrito). El objetivo fue relacionar el decaimiento del  $\bullet\text{NO}$  ( $-\text{d}[\text{NO}]/\text{dt}$ ), la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\text{d}[\text{H}_2\text{O}_2]/\text{dt}$ ) y la formación de  $\text{ONOO}^-$  con la concentración de ubiquinol en mitocondrias y partículas submitocondriales (PSM) de hígado. La adición de ubiquinona reducida por PSM aumentó 20% el  $-\text{d}[\text{NO}]/\text{dt}$  y el  $\text{d}[\text{H}_2\text{O}_2]/\text{dt}$  mientras que la SOD disminuyó en 30 % el  $-\text{d}[\text{NO}]/\text{dt}$  y en 66% el tiempo de inhibición por  $\bullet\text{NO}$  de la citocromo oxidasa que fue revertido por SOD. El  $\text{d}[\text{H}_2\text{O}_2]/\text{dt}$  fue aumentado de manera dosis dependiente por  $\bullet\text{NO}$  hasta los  $3 \mu\text{M}$ , a concentraciones mayores decrece por la formación de  $\text{ONOO}^-$ . Asimismo, observamos que el  $\text{ONOO}^-$  oxida al  $\text{QH}_2$  de acuerdo a la reacción [5]  $\text{ONOO}^- + \text{QH}_2 \rightarrow \bullet\text{NO}_2 + \text{Q}\bullet + \text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2^{\bullet-} + \text{NO}_2 + \text{Q}$ . Se concluye que la producción de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  en la mitocondria se debe a reacciones del  $\bullet\text{NO}$  y el  $\text{ONOO}^-$  con  $\text{QH}_2$  que controlan los niveles del  $\bullet\text{NO}$  y sus efectos inhibitorios.

**164. Reacción entre el ubiquinol y el peroxinitrito.** FJ Schöpfer, NA Riobó, MC Carreras, CL Lisdero, A Boveris, JJ Poderoso.

*Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno y Cátedra de Físicoquímica, Universidad de Buenos Aires.*

La reacción entre el ubiquinol ( $\text{QH}_2$ ) y el óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ) produce anión nitroxilo y semiquinona y, en presencia de oxígeno, anión superóxido; la producción simultánea de  $\bullet\text{NO}$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$  tiene como principal producto peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) ( $k = 6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{seg}^{-1}$ ). El propósito fue analizar una nueva reacción entre el ubiquinol y el peroxinitrito para formar como productos dióxido de nitrógeno y ubisemiquinona. El análisis espectrofotométrico demostró la oxidación del ubiquinol a ubiquinona por  $\text{ONOO}^-$ . Se detectó por EPR la generación del radical libre intermediario ubisemiquinona. Se confirmó el efecto protector de 0-400  $\mu\text{M}$  ubiquinol en la nitración de albúmina producida por 500  $\mu\text{M}$   $\text{ONOO}^-$  por Western blot. El mismo efecto protector se evidenció a 0.3 y 0.5 mM  $\text{ONOO}^-$  luego de la suplementación de partículas submitocondriales (4 mg/ml) con 0-100  $\mu\text{M}$   $\text{UQ}_2$  y 6 mM succinato/ 6  $\mu\text{M}$  mixotiazol para asegurar su reducción. Finalmente, se determinó con un experimento de competencia simple con citocromo c, la constante de reacción del  $\text{QH}_2$  con  $\text{ONOO}^-$  en  $1.31 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{seg}^{-1}$ .

**165. El ubiquinol previene el daño mitocondrial mediado por peroxinitrito.** CL Lisdero, FJ Schöpfer, NA Riobó, MC Carreras y JJ Poderoso.

*Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires*

El óxido nítrico ( $\text{NO}$ ) ha sido recientemente implicado en el control del metabolismo oxidativo mitocondrial. El  $\text{NO}$  promueve la liberación de anión superóxido a través de la reacción con el ubiquinol ( $\text{UQ}$ ). El peroxinitrito, producto de la reacción del anión superóxido con el  $\text{NO}$ , reacciona a su vez con el ubiquinol, lo que puede disminuir la nitración de las proteínas mitocondriales. Así, el objetivo de este estudio fue comparar el daño producido por la endotoxemia sobre las mitocondrias de diafragma y corazón de rata, dos órganos que contienen distintas concentraciones tisulares de

ubiquinol. La endotoxemia se indujo con una inyección i.p. de LPS (10 mg/kg). Se aislaron las mitocondrias del corazón y del diafragma y se analizaron: el consumo de oxígeno y estado de acoplamiento de la cadena de transporte de electrones con la fosforilación del ADP (control respiratorio), la producción de peróxido de hidrógeno (producido por dismutación de anión superóxido) y su correlación con la nitración de proteínas mitocondriales. Los resultados mostraron que las mitocondrias de diafragma (39,7  $\mu\text{g}$   $\text{UQ}/\text{g}$  de tejido) son más sensibles al daño oxidativo que las mitocondrias de corazón (114  $\mu\text{g}$   $\text{UQ}/\text{g}$  de tejido).

**166. Daño pancreático en diabetes por estreptozotocina: Influencia del óxido nítrico en los sistemas antioxidantes.** Elida Gonzalez, A Jawerbaum, V Navarro, D Sinner, J Roselló-Catafau, MAF Gimeno.

*CEFYO-CONICET, Buenos Aires*

La destrucción pancreática por estreptozotocina (STZ) involucra distintas sustancias vasoactivas. Se estudia aquí la participación del óxido nítrico ( $\text{NO}$ ) y su influencia sobre el estado oxidativo del tejido. Se determinaron niveles de nitritos/nitratos (N) (nmol/mg prot); actividad de óxido nítrico sintasa (NOS) (pmol  $\text{NO}/\text{min}$ . 100 mg ps) y niveles de superóxido dismutasa (SOD) (U/mg prot) en tejido pancreático de ratas sanas (C) y diabéticas por STZ (D). Los niveles de N fueron mayores en D ( $4.25 \pm 0.75$ , n=7) que en C ( $1.16 \pm 0.40$ , n=7) ( $p \leq 0.05$ ), al igual que la actividad de NOS (D:  $0.30 \pm 0.03$ , n=7, C:  $0.19 \pm 0.01$ , n=6,  $p \leq 0.05$ ). La actividad de SOD fue menor en D ( $15.2 \pm 1.6$ , n=6) que en C ( $27.0 \pm 1.2$ , n=6) ( $p \leq 0.01$ ). La preincubación con nitroprusiato de sodio 600  $\mu\text{M}$  (dador de  $\text{NO}$ ), disminuyó los niveles de SOD en ratas C ( $14.6 \pm 1.3$ , n=7,  $p \leq 0.01$ ). En D, la presencia de L-NMMA 600  $\mu\text{M}$  (inhibidor de NOS), aumentó los niveles de SOD ( $24.5 \pm 2.5$ , n=7,  $p \leq 0.05$ ). Estos resultados parecen indicar que a) Los niveles de  $\text{NO}$  se incrementan durante el desarrollo de la lesión pancreática. b) El aumento de  $\text{NO}$  parece estar relacionado con la disminución en la capacidad antioxidante del tejido durante el daño químico.

**167. Metabolismo del complejo  $\alpha 2\text{M}$ -MFP en la rata.** L Esteban, Laura Pera, A Rigalli, RC Puche

*Laboratorio de Biología Osea, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario*

El complejo  $\alpha 2\text{M}$ -MFP se forma en plasma después de cada dosis de MFP. Esta proteína pierde actividad y es reconocida y metabolizada por proteólisis vía receptores tisulares. Este proceso aumenta la biodisponibilidad del flúor del MFP. Se midió el clearance plasmático de  $\alpha 2\text{M}$ -MFP en 20 ratas de 200g que recibieron 80 mmoles de MFP por vía oral, antes ( $0.013 \pm 0.004 \text{ min}^{-1}$ ) y después ( $0.011 \pm 0.008$ ) de anular la circulación hepática (ligadura del tronco celíaco y vena porta). En otro experimento se trataron ratas con 80 mmoles de NaF ó MFP/día/30 días. Como el flúor óseo total fue mayor en las ratas tratadas con MFP que con NaF ( $13.9 \pm 2.7$  moles/g vs.  $2.9 \pm 2.5$ ,  $P < 0.01$ ) se analizaron las proteínas (no colágenas) extraídas del hueso, identificándose proteínas (2200 a 60000 Da) con flúor ligado, sólo en los animales tratados con MFP. Se concluye que la depuración hepática del complejo es poco significativa. La presencia de proteínas y péptidos con flúor ligado en la matriz ósea indica la importancia de este tejido en el metabolismo del complejo.

## REPRODUCCION

**168. Mecanismos responsables de la estimulación de la secreción testicular de hormona anti-Mülleriana por la FSH.** Céline Croisier-Lukas<sup>1</sup>, M Dutertre<sup>1</sup>, JY Picard<sup>1</sup>, Nathalie Josso<sup>1</sup>, R Rey<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>INSERM U.493, Montrouge, Francia; <sup>2</sup>CEDIE, Hospital de Niños R. Gutierrez Buenos Aires.

La secreción de hormona anti-Mülleriana (AMH) por las células de Sertoli del testículo prepúbere es estimulada por FSH. Usando una línea inmortalizada de células de Sertoli prepúberes (SMAT1), estudiamos los mecanismos de regulación de la AMH FSH-dependientes. El promotor de la AMH presenta un TRE (Elemento de Respuesta al ester de forbol TPA), capaz de unir al factor AP1 (dímero Jun/Fos). A su vez, c-Jun y c-Fos son estimulables por el AMPc, segundo mensajero de la FSH. Las células SMAT1 fueron transfectadas con una construcción 'Promotor AMH-Luciferasa' y cultivadas en condiciones basales o con dbAMPc o TPA. El dbAMPc (5 mM) aumentó la actividad luciferasa (187±5 % respecto del basal) recién a las 36 horas, mientras que el TPA (500 nM) ejerció una estimulación de 106±60 % a las 6 horas y de 417±312% a las 36 horas. En conclusión, la estimulación de la AMH por la FSH podría involucrar una activación temprana, AMPc-dependiente, de c-Jun y c-Fos, que formarían AP1, el cual transactivaría ulteriormente el gen de la AMH.

**169. Efecto de la inhibición de la óxido nítrico sintasa (NOS) sobre el transporte oviductal en la rata.** S Perez Martínez, M Viggiano, A Franchi, B Herrero, ME Ortiz, M Villalón, M Gimeno

CEFYBO-CONICET; Universidad de Reproducción y Desarrollo, Universidad Católica, Santiago de Chile

En este trabajo estudiamos la participación del NO endógeno en la regulación del transporte oviductal de los ovocitos y/o embriones (huevos). Se evaluó la habilidad de distintos inhibidores (I) de NOS para modificar el transporte de los huevos en ratas en estro y preñadas. Los I fueron inyectados dentro de la bursa, y 24 h más tarde se analizó la distribución de los huevos en el tracto reproductor. Los resultados indicaron que tanto en ciclo como en preñez los I de NOS producen una aceleración del transporte ovular, observándose una disminución en el n° de huevos en el oviducto; la dosis de 1 mg/kg de los 3 I (L-NAME, L-NMMA, L-NO<sub>2</sub>) utilizados produjo una reducción de 35% y el efecto máximo (50%) se obtuvo con 10 mg/kg de L-NAME (C: 12.4, n=5; I: 5.6, n=5; p<0.001). El efecto aceleratorio observado fue revertido a valores control, utilizando un liberador de NO (Spermine NONOate, 5 mg/kg) (D)(C: 11.6; I: 7; D: 12, n=5/grupo p<0.01). Se realizaron ensayos de contractilidad del órgano mediante el uso de microesferas. Las esferas fueron inyectadas dentro del oviducto y a las 24 h se administró solución salina o L-NMMA y se estudió su movimiento con una cámara de video. Estos resultados mostraron que el I aumenta la velocidad de la microesfera (mm/seg) (C: 482±51 (n=367); I: 1713±131 (n=479), p<0,001). Los resultados sugieren que el NO endógeno participa en la regulación del transporte oviductal de la rata a través de la modulación negativa de la contractilidad.

**170. Anticuerpos anti-ovario y falla ovárica prematura.** L Bussman, Violeta Chiauzzi, EH Charreau.

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires

Uno de los principales elementos en la identificación de la etiología autoinmune de la falla ovárica prematura (POF), es la detección de anticuerpos circulantes contra antígenos del ovario. Sin embargo, existen cuestionamientos sobre la interpretación de los resultados como consecuencia de las marcadas variaciones en las frecuencias observadas con métodos diferentes. Es por lo tanto importante, determinar marcadores inmunológicos objetivos de valor diagnóstico y pronóstico de POF. En estudios previos, mediante un ensayo de dot blot-ELISA, detectamos en 79 pacientes (32.4%) de un total de 244 POF reacción positiva contra proteínas de ovarios humanos. En el presente trabajo, 54 sueros de pacientes POF y 36 controles fueron analizados por Western blot utilizando como antígenos, proteínas citosólicas depletadas de IgG. Proteínas de músculo y placenta fueron utilizadas para evaluar

especificidad tisular. Sólo el 11% de los sueros POF evidenciaron la presencia de un antígeno específico, de peso molecular 55 kDa. La detección de anticuerpos contra proteínas específicas del ovario permitirá distinguir el diagnóstico de POF autoinmune proveyendo bases para su apropiada terapia.

**171. Participación de la proteína epididimaria humana "ARP" en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito.** DJ Cohen<sup>1</sup>, D Ellerman<sup>1</sup>, Morgenfeld M<sup>1</sup>, M Hayashi<sup>2</sup>, S Nishi<sup>2</sup>, M Kasahara<sup>2</sup>, PS Cuaniscu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires, <sup>2</sup>Hokkaido University, School of Medicine, Japan.

La proteína epididimaria humana ARP presenta 40% de homología con DE, una proteína de rata que participa en el proceso de fusión espermatozoide (ES)-ovocito. Con el objeto de estudiar el papel funcional de ARP, estudiamos su asociación a la superficie del ES como así también su participación en la fusión de gametas. Los experimentos de extracción de proteínas mostraron que mientras cierta proporción de ARP puede ser liberada del ES con alta fuerza iónica (2M NaCl), la remoción total de la proteína sólo puede obtenerse por el tratamiento subsecuente con el detergente Triton X-100, indicando que ARP está fuertemente unida a la superficie del ES. La incubación de ES capacitados con el anticuerpo policlonal anti-ARP no afectó el porcentaje de ES móviles ni produjo aglutinación. Anti-ARP tampoco produjo inhibición en la ocurrencia de la reacción acrosomal espontánea o inducida por ionóforo de calcio. Finalmente, la presencia de anti-ARP inhibió significativamente el porcentaje de ovocitos de hamster sin zona pellucida penetrados por ES humanos (22% vs 6.1%, (medio solo, p<0.001) o 55% (anti-MBP, p<0.01)), sin afectar el porcentaje de ovocito con ES unidos ni el número de ES unidos por ovocito. Estos resultados indican la participación de ARP en el proceso de fusión de gametas.

**172. Cambios de la permeabilidad al agua durante la maduración en ovocitos humanos y de rata.** Muriel Parisi<sup>1</sup>, Alicia Jawerbaum<sup>2</sup>, Jaime Moguilevsky<sup>1</sup>, Marta Fernandez<sup>2</sup>, Mario Parisi<sup>1</sup>, Ester Polak<sup>3</sup>, Paula Ford<sup>1</sup>.

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina<sup>1</sup>, CEBYFO-CONICET<sup>2</sup> y Centr. esp. Reprod. (CER<sup>3</sup>)

**Objetivos:** Investigar el rol de los canales de agua en los ovocitos de mamífero y su eventual importancia en la criopreservación. **Métodos:** Los cambios volumétricos inducidos por un gradiente osmótico (270 mOsm) fueron analizados por videomicroscopía en ovocitos humanos en estadio de vesícula germinal (HVG, n=4), en estadio de metafase II (HMII, n=14) y en ovocitos de rata en proestro (RP, n=51) y en estro (RE, n=22). **Resultados:** La permeabilidad osmótica (Posm, cm. s<sup>-1</sup>) fue mayor en HVG (11.5 ± 1.1) que en HMII (7.3 ± 1.0), p<0.05). Asimismo la Posm fue mayor en RP (12.9 ± 0.9) que en RE (8.0 ± 0.6), p<0.001. La diferencia entre RP y RE fue reversiblemente eliminada por la preincubación con HgCl<sub>2</sub> y no fue observada en ovocitos de ratas con diabetes inducida por estreptozotocina. La disminución del volumen del ovocito, en presencia de un gradiente hipertónico de glicerol, fue transitoria en RE y no en RP. **Conclusiones:** Los ovocitos de rata y humanos mostraron permeabilidades osmóticas semejantes y tendrían similar evolución en distintos estadios de su desarrollo. El ovocito de rata posee un canal para agua que desaparecería, o no sería funcional, durante la maduración y que no estaría presente en ratas diabéticas.

**173. Posible efecto de la inhibina sobre la diferenciación del folículo ovárico.** A Vitale, MG Ballerini, L Loureiro, S Campo, M Tesone

IBYME-CONICET, FCEYN, UBA, y CEDIE, Buenos Aires

La acción de LH en el arresto de la división celular durante la diferenciación del folículo ovárico a cuerpo lúteo (CL) estaría mediada por la producción de un factor inhibitorio sintetizado por

las células de granulosa (CG). El medio condicionado de CG luteínicas humanas (MC), contiene un factor de naturaleza proteica (PM>30.000) que inhibe el crecimiento de CG inmaduras de rata en cultivo (inhibición de la incorporación de  $T^3H$ : 60%). Se sugiere que dicho factor podría ser la inhibina producida por CG actuando en forma autocrina. Se midió la concentración de inhibina en MC por un ensayo inmunoenzimático específico para la forma A y B encontrándose altos niveles de inhibina A ( $4,47 \text{ ng}/1 \times 10^6$  células). Se ensayó el efecto de distintas concentraciones de inhibina A humana recombinante sobre la proliferación de CG de rata estimuladas por Estradiol ( $500 \text{ ng}/\text{ml}$ ) y TGF $\beta$  ( $5 \text{ ng}/\text{ml}$ ). Se observó inhibición de la proliferación ( $28,4 \pm 2,6\%$  de inhibición =  $0,04 \text{ pg}/\text{ml}$  de inhibina;  $28,2 \pm 5,0\%$  =  $0,4 \text{ pg}/\text{ml}$ ;  $31,5 \pm 5,0\%$  =  $4 \text{ pg}/\text{ml}$  y  $74,5 \pm 6,3\%$  =  $4000 \text{ pg}/\text{ml}$ ). Esto fue confirmado, aunque con menor sensibilidad, por un método que mide actividad metabólica (MTS):  $58,74 \pm 1,83\%$  de inhibición =  $400 \text{ pg}/\text{ml}$  de inhibina. Se concluye que la inhibina A producida por CG luteínicas humanas podría regular la transformación del folículo a CL.

## INFECTOLOGIA II BACTERIOLOGIA Y PARASITOLOGIA

### 174. *Escherichia coli* libera vesículas con DNA durante la fase estacionaria. N Sanjuan, Marta Almirón, R Kolter

Department of Microbiology & Molecular Genetics Harvard medical School, Boston, USA

La fase estacionaria de crecimiento es aquella en la cual las poblaciones bacterianas normalmente viven en la naturaleza. Los eventos biológicos de esta fase son poco conocidos. El objeto de este trabajo fue estudiar algunas características ultraestructurales de cultivos bacterianos en fase estacionaria. Se emplearon las cepas de *Escherichia coli* 17-2 (enteroagregativa, salvaje) y K-12, de laboratorio, crecidas en medio LB a  $37^\circ\text{C}$ , y estudiadas en distintos momentos de la curva de crecimiento por microscopía electrónica (ME) con tinción negativa. Sólo en la fase estacionaria se observaron vesículas de  $120\text{-}200 \text{ nm}$  brotando hacia el medio desde el soma bacteriano. Las vesículas fueron purificadas por precipitación con PEG y ultra-centrifugación diferencial. En cortes ultrafinos de ME se las ve rodeadas de una unidad de membrana y con un centro electrón-denso. Se detectaron hebras de DNA bi y monocatenario en las vesículas por el método de Kleinschmidt y sombreado metálico, y por electroforesis en geles de agarosa. El DNA parece ser cromosómico y está asociado a proteínas. Entre estas se detectó a p-20, una proteína externa de fase estacionaria, ya descrita por los autores. Se propone que este es un nuevo mecanismo de liberación de material genético, hasta hoy no descrito en *E. Coli*.

### 175. Detección de diferencias por Inmunoblot entre *Leptospiras interrogans* de cepario y aislamientos provenientes de las localidades de Ameghino, Rufino y Navarro. Adriana Fontanals, Alicia Escudero, L Sammartino, Silvia Mundo

Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA; \*INTA Castelar.

*Leptospira interrogans pomona* infecta al ganado bovino causando abortos. La medida preventiva es la vacunación con bacterinas. A fin de detectar diferencias inmunogénicas entre cepas vacunales e aislamientos, se analizaron sueros de animales vacunados e infectados mediante técnicas de inmunoblot. Se estudiaron 10 bovinos vacunados con vacuna comercial y 10 bovinos positivos a la aglutinación microscópica frente a serovariedad *pomona*. Por PAGE se observó múltiples bandas en la zona de  $100 \text{ kDa}$  hasta  $35 \text{ kDa}$  y pocas en la zona desde  $30$  hasta  $6,5 \text{ kDa}$ , sin poder detectarse diferencias entre los antígenos de cepario y los aislamientos. El análisis de los inmunoblots de los aislamientos y cepas vacunales frente a cada uno de los sueros demostró escasa reacción antígeno anticuerpo en la zona de alto peso molecular y gran cantidad de bandas a partir de  $45 \text{ kDa}$  y hasta  $12 \text{ kDa}$ . Frente a los aislamientos pudo verse una banda

de reacción muy fuerte en la zona de  $25$  a  $45 \text{ kDa}$ ; esta zona no pudo detectarse frente a los antígenos de cepario. Se observa pérdida de inmunogenicidad en las cepas vacunales con respecto a las de aislamiento por adaptación al cultivo.

### 176. Estudio de PCR en Chagas pediátrico. J Altcheh, S Brandariz, M Biancardi, M Levin, A Schijman, H Freilij

Parasitología, Hospital de Niños R. Gutierrez; INGENI-CONICET, Buenos Aires.

Dos ensayos de PCR para la amplificación de  $330 \text{ pb}$  de ADN minicrículo y de  $188 \text{ pb}$  de satélite nuclear fueron desarrollados para detección de *T. cruzi* en sangre. Se analizó su validez para el diagnóstico y respuesta al tratamiento (nifurtimox) en 32 niños. Criterios diagnósticos: en  $<$  de  $6 \text{ m}$  *T. cruzi* en sangre (microhematocrito), en  $>$  de  $6$  meses serología reactiva por 2 técnicas. Resultados: Infectados: n:14, edad x:  $48 \text{ m}$  ( $2\text{m}\text{-}13\text{a}$ ), PCR +:  $11/14$  ( $78,5$ ); No infectados: n:18, edad x:  $19 \text{ m}$  ( $21\text{d}\text{-}10\text{a}$ ), PCR +:  $1/18$  ( $5,6$ ). En los controles postratamiento 5 niños negativizaron la PCR persistiendo con serología reactiva. Conclusiones: La PCR mostró una sensibilidad del  $78,5\%$  al diagnóstico. Esta técnica sería de utilidad como marcador precoz de la respuesta al tratamiento.

### 177. Enfermedad de Chagas en Pacientes trasplantados renales. Susana Albano, Valeria Mas, Graciela Boccardo, C Giraudo, P Massari, Teresita Alvarelos.

Hospital Privado, Centro Médico de Córdoba

El agente causante de la enfermedad de Chagas (Ech) es el tripanosoma *Cruzi* (T.C). En el año 1988, el INCUCAI, autorizó la utilización de riñones de donantes serológicamente positivos. En el presente estudio valoramos la respuesta clínica postrasplante y la presencia de ADN del TC. Se estudiaron 177 trasplantes (tx) renales en el período 1994-1997. Todos los ptes fueron testeados pre-tx serológicamente con (HIA) y (TIF). Diecisiete de 177 receptores tuvieron serología positiva (Sp) o donante con Sp. Se incluyó un grupo control de 10 ptes con tx renal con serología negativa (Sn) y donantes con Sn. Los ptes fueron retesteados serológicamente y se realizó PCR para T.C a los  $23,3 \pm 11$  meses post tx. [9-31]. Nueve de 17 ptes ( $7\text{h}\text{-}2\text{m}$ ) edad media  $43,8 \pm 16$  años [19-61] tuvieron Sp y donantes Sn (Grupo1). Uno de estos ptes murió a causa de un evento no relacionado a Ech. Ocho de 8 fueron HAI(+), 5/8 TIF(+) y 6/8 PCR(+). Ocho /17 ptes ( $7\text{h}, 1\text{m}$ ), edad media  $41,6$  años [10-71], tuvieron Sn y recibieron un riñón de donante Sp (Gr. II). Un pte murió de una complicación no relacionada a Ech, otro pte abandonó el seguimiento. Uno de 6 tuvo HAI y TIF(+) y 5/6 tuvieron PCR(+). El grupo control mostró Sn y PCR(-). En la mayoría de estos ptes se pudo detectar la presencia de ADN del T.C en sangre periférica sin signos de reactivación o Ech aguda en el período de estudio. No hubo diferencia significativa en la sobrevida de los pacientes y de injertos con el grupo control. El hallazgo de ADN de T.C en ptes Sn, debería alertar sobre la posibilidad de transmisión de Ech por trasplante de órgano sólido.

### 178. Efecto de la vacunación intramamaria en la respuesta inmune local contra *Staphylococcus aureus*. Marisa Gómez, Fernanda Buzzola, Cristina Cerquetti, Verónica García, D. Sordelli.

Facultad de Medicina, UBA; CEFyBO-CONICET

Se ha demostrado la factibilidad de utilizar cepas vivas atenuadas (CVA) de *S. aureus* por vía intramamaria (*Ima*) para generar protección frente al desafío experimental con *S. aureus*. La inmunización indujo la presencia de significativos niveles de anticuerpos en leche. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la vacunación *Ima* sobre la respuesta proliferativa de linfocitos provenientes de ganglios asociados a la glándula mamaria. De acuerdo a los diferentes esquemas que indujeron protección, se inmunizaron ratones hembra con una CVA de *S. aureus* por ruta *Ima* durante la última semana de la preñez. Al

cabo de 7 días, linfocitos de ganglios epigástricos se cultivaron en presencia de diferentes preparaciones antigénicas de *S. aureus*. Linfocitos provenientes de animales inmunizados mostraron respuestas proliferativas frente a *S. aureus* (bacteria muerta por calor y extracto de proteínas totales) significativamente mayores ( $p < 0,05$  Test de Wilcoxon) con respecto a los controles (ratones inoculados con salina). Se concluye que la vacunación por vía *Ima* con CVA de *S. aureus* induce poblaciones de linfocitos con memoria capaces de responder frente a una infección posterior por *S. aureus*.

**179. Detección Rápida de Mycobacterium paratuberculosis por DMG (DNA Metyltransferases Genotyping).** Silvia Mundo, Alicia Escudero, G Cicutin, O Lopez.

Facultad de Veterinarias, Universidad de Buenos Aires

*Mycobacterium paratuberculosis* (Mp) es un patógeno intracelular que causa la enfermedad de Jones en el bovino y posiblemente la enfermedad de Crohn en el humano. Produce una enfermedad persistente y se transmite a través de la leche de la vaca al ternero. Su resistencia a la pasteurización lo convierte en un riesgo potencial para la salud humana. En nuestro laboratorio hemos desarrollado un método rápido de diagnóstico de Mp basado en DMG. El Mp tiene una inserción característica de 1475 pb dentro de su genoma (IS900) repetida hasta 12 veces, que sirve como blanco para diagnóstico por PCR y permite diferenciarlo de otros *Mycobacterium*. Se diseñaron primers biotinilados o no, que amplifican un fragmento pequeño de 153 pb, lo que permitió acortar los tiempos del PCR a 20 minutos. El amplicón posee dos sitios de metilación específicos para las metiltransferasas M.CviRI y M.dam y para las enzimas de restricción MspI y AclI. Inmediatamente a la obtención, se metila utilizando SAM tritiado y se detecta por métodos radiométricos. La especificidad de sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción y las metiltransferasas permite corroborar la especificidad del producto obtenido. La rapidez y posibilidad de automatización de este método permite el análisis de muchas muestras en corto tiempo.

**TUMORES V**

**EXPRESION PROTEICA Y TUMORIGENESIS**

**180. Terapia génica en tumores de cerebro mediante el uso combinado del gen suicida HSV-tk/GCV (timidina quinasa del virus Herpes Simplex/ganciclovir) y citoquinas.** M.Berenstein<sup>1</sup>, L.Chemes<sup>1</sup>, S. Adris<sup>1</sup>, M.V.Guagliardo<sup>1</sup>, I. Sorin<sup>2</sup>, Y. Chernajovsky<sup>3</sup>, O Podhajcer<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Fundación Campomar, <sup>2</sup>Hospital E. Perón; <sup>3</sup>Kennedy Institute of Rheumatology, London,UK

La transferencia del sistema HSVtk/GCV, en un modelo de glioma C6 de rata, establecido por estereotaxis, mostró un efecto antitumoral y la generación de una respuesta de memoria. Estos resultados nos llevaron a combinar dicho sistema con la transferencia genética de IL-12. Inicialmente, el 70% de los animales inoculados con C6 productoras de IL-12 (C6-IL-12) (n=7) sobrevivió a los controles C6-neo (n=6), mostrando ausencia o mínima masa tumoral residual. La coinyección de células C6 con células productoras de retrovirus conteniendo el gen HSVtk (VPC-tk), el gen de IL12 (VPC-IL12) o la combinación de ambos (n=6 por grupo) mostró una sobrevida mayor a 90 días en el 33-50% de los animales ( $p < 0,0001$  con respecto al control). En tumores C6 de 5 días, el tratamiento con VPC-IL12 (n=12), VPC-tk (n=12) o la combinación de ambos (n=9) logró erradicar el tumor en un 35, 42 y 40% de los animales, respectivamente. En tumores C6 de 3 días, el tratamiento con VPC-tk (n=8) o combinado con VPC-IL12 (n=8), logró un aumento de la sobrevida a más de 60 días del 75 y 50% respectivamente, con respecto al grupo control (n=3). En todos los casos, las ratas sobrevivientes rechazaron un desafío con

células C6 implantadas en el hemisferio contralateral. Controles tratados con VPC-neo no mostraron una supervivencia significativamente diferente del control. Los resultados sugieren que la transferencia del gen de IL-12 puede curar gliomas de rata. Resta determinar bajo que condiciones la combinación de HSVtk + IL-12 resulta más efectiva.

**181. Expresión de proteína p21 y p27 en la regresión de un adenocarcinoma mamario murino inducida por estrógenos y por antiprogéstágenos.** Silvia Vanzulli, Eleonora Pagano, Claudia Lanari y AA Molinolo.

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

La línea del adenocarcinoma mamario murino transplantable 59-2-HI de crecimiento autónomo regresiona con estradiol ( $E_2$  pellet de 5mg) o con los antiprogéstágenos: ZK 98299 (10mg/kg/día) y RU 486 (6,5mg/kg/día) sc. Se demostró morfológicamente que un efecto citostático sostenido y un pico de apoptosis entre las 24 y 48hs de tratamiento participan en la regresión. En este trabajo se estudia la expresión de las proteínas p21 y p27 en relación a los efectos descritos previamente. Ratonas hembras Balb/c portadores de tumor de 25 a 50 mm<sup>2</sup> se trataron con  $E_2$ , ZK o RU o no recibieron tratamiento. Los tumores fueron resecaados diariamente entre las 24 y 96 hs de tratamiento para determinar la expresión de p21 y p27 mediante técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos policlonales detectados por el método ABC. Se cuantificó la positividad nuclear en 10 campos de 100x. Los resultados mostraron en los controles (p21=12,26±7,12; p27=14,15±8,34); a las 24hs pos-tratamiento:  $E_2$  (p21=132,7±28,05; p27=126,1 ±10,71), RU (p21=82,6±12,38; p27=62,7±8,14) y ZK (p21=79,4± 9,32; p27= 75,45±8,70) y a las 96hs :  $E_2$  (p21=50,6±9,78; p27 =47,2±5,53), RU(p21=7,9±2,33; p27=4,7±1,70) y ZK (p21=31,3 ±4,69; p27= 29,1±7,99). Los tres tratamientos a las 24 hs inducen un significativo aumento ( $p < 0,001$ ) de la expresión de ambas proteínas y los mismos disminuyen a los cuatro días en correlación con los hallazgos de apoptosis.

**182. PTA modula el estado de fosforilación de proteínas dependientes de Ca<sup>2+</sup>-CaM en extractos celulares de mamíferos y anfibios.** G Barisone\*, A Vidal\*\*, F Vega\*\*, M Cabada\*, F Domínguez\*\*

\*PROMUBIE (Conicet), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR,Rosario; \*\*Departamento de Fisiología, Universidad de Santiago de Compostela, España.

La Protimosina alfa (PTA) es una proteína de 12,6 kDa, filogenéticamente conservada y encontrada en gran variedad de tejidos. Originalmente considerada una hormona lítica, datos actuales indican una relación con la proliferación y diferenciación celular. Elevados niveles de PTA se correlacionan con la capacidad proliferativa celular en tumores malignos. Se ha demostrado que PTA modifica la actividad de calmodulina quinasa (CaMK). El objetivo de este trabajo consiste en la caracterización del patrón de fosfoproteínas inducido por PTA. El agregado de PTA a extractos de la línea NIH-3T3 provoca la desfosforilación de una proteína de 40 kDa. El efecto resultó dependiente de Ca<sup>2+</sup> y calmodulina (CaM). La proteína fue purificada y secuenciada, demostrando ser G3PDH, enzima sustrato de CaMKII. Mediante técnicas de fosforilación *in vitro* y Western Blot, se comprobó que PTA induce la fosforilación de CaMKII. Experimentos realizados sobre extractos de ovocitos del anfibio *Bufo arenarum* indicaban resultados similares. Estos datos permiten proponer que PTA afecta el estado de fosforilación de CaMKII, regulando su actividad y por lo tanto la fosforilación de sus sustratos.

**183. Tumores de la granulosa obtenidos por oncogénesis rígida conservan la expresión del receptor de la hormona anti-Mülleriana (AMH-R) : un modelo para "targeting" diagnóstico y terapéutico.** Wen-Qing Long, M Dutertre, Lucile

Gouédard, Nathalie di Clemente, JY Picard, Nathalie Josso, R Rey.

INSERM U.493, Ecole Normale Supérieure, Montrouge, Francia.

Las recidivas de los tumores de la granulosa (TG) del ovario, que expresan AMH-R, tienen una alta tasa de mortalidad. En el sexo femenino después del nacimiento, AMH-R se expresa exclusivamente en las células de la granulosa: un *targeting* diagnóstico y terapéutico sería entonces factible ante un TG, usando al AMH-R como blanco. Ratones transgénicos, obtenidos por oncogénesis dirigida, fueron usados como modelo experimental. Las hembras desarrollaron TG, que expresaban AMH-R. Una línea celular clonal fue derivada de un TG. Luego de 15 pasajes la línea celular conservaba la expresión de AMH-R, detectada por Northern blot e hibridación *in situ*, y unía AMH marcada con iodo radioactivo. Los ratones transgénicos que desarrollan TG y la línea celular derivada representan una herramienta de utilidad para desarrollar una estrategia de *targeting* diagnóstico y terapéutico de los TG, usando como blanco al receptor de la AMH.

- 184. Expresión alterada de retinoblastoma, p16 y ciclina D1 en tumores paratiroides.** Irene Szijan, Viviana Dalamón, Patricia Vergani, Karina Danilowicz, N Mezzadri, Irene Orlow, OA Bruno

División de Endocrinología y de Cirugía Oncológica, Departamento de Patología, Cátedra de Genética y Biología Molecular, Hospital de Clínicas, UBA; Memorial-Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA

Las alteraciones en oncogenes y/o genes supresores tumorales llevan al desarrollo de tumores y pueden usarse como marcadores de malignidad. Los carcinomas paratiroides son difíciles de distinguir histológicamente de los adenomas y es necesario un método de diagnóstico diferencial. Con este objeto se estudiaron genes reguladores del ciclo celular: RB, p16 y ciclina D1, en 6 adenomas y 5 carcinomas paratiroides, por determinación de: a) Pérdida alélica (LOH) por medio del análisis del microsatélite RB1.20 y b) Expresión de RB, p16 y ciclina D1 por inmunohistoquímica. Uno de 6 adenomas y 1 de 2 carcinomas mostraron LOH. La proteína RB estaba ausente en 4 de los 5 carcinomas y presente en todos los adenomas. En cambio, ciclina D1 estaba ausente en todos los adenomas y presente en 3 de los 4 carcinomas. El carcinoma que presenta RB es el mismo que no expresa ciclina D1 se comportaría como adenoma. p16 dió positivo solo en un carcinoma. Estos resultados muestran una expresión normal de RB y ciclina D1 en adenomas y ausencia de RB junto con una sobreexpresión de ciclina D1 en carcinomas. Esto podría servir como método para el diagnóstico de carcinomas.

- 185. Expresión de c-fos y PCNA en un tumor mamario experimental.** Alicia Gutierrez, Claudia Cocca, Gabriela Martín, Graciela Cricco, Elena Rivera, H. García\*, E. Mocetti\*, M. Croci, Rosa Bergoc.

Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; \*Servicio Anatomía Patológica, Hospital Italiano, Buenos Aires

El objetivo de este trabajo fue analizar la expresión de c-fos, gen clásicamente relacionado con la expresión temprana de eventos proliferativos, y PCNA, proteína relacionada con la proliferación celular, en un tumor mamario experimental inducido mediante inyección ip de N-nitroso-N-metilurea en ratas normales y diabéticas. Para ello se emplearon técnicas inmunohistoquímicas. Muestras representativas de todos los tumores fueron congeladas para la detección de c-fos o conservadas en formalina para la detección de PCNA, seccionadas, incubadas con los respectivos anticuerpos y teñidas. La observación microscópica y conteo de 10 campos por muestra indicó que ambas proteínas se expresan en mayor proporción en los tumores de ratas normales respecto a diabéticas: el 56,2% de los núcleos totales expresaron c-

fos en tumores normales y sólo el 7% en las diabéticas; en cuanto a PCNA, se contaron  $18 \pm 2$  núcleos positivos en normales versus  $8 \pm 1$  en diabéticas. Los resultados concuerdan con el patrón de malignidad previamente reportado en los tumores de ratas normales y las adenosis benignas observadas en las diabéticas.

## RIÑÓN II FISIOPATOLOGÍA RENAL

- 186. Caracterización de la membrana basal glomerular (MBG) en la glomerulopatía inducida por HgCl<sub>2</sub> en ratas.** E Botta, G Girardi

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

Previamente demostramos que las ratas tratadas con HgCl<sub>2</sub> (5mg/kg, s.c.) desarrollan a la hora de su administración una insuficiencia renal aguda con compromiso glomerular, caracterizada por alta infiltración leucocitaria en glomérulos aislados (GA) y marcada albuminuria. *Objetivo:* caracterizar la MBG en animales intoxicados con HgCl<sub>2</sub>. Se trabajó con 2 grupos experimentales: control (C) y Hg. Se determinó: a) permeabilidad a la albúmina (Alb) en GA, b) electroforesis de orina, GA y MBG e identificación de fibronectina (Fn) y laminina (L) por western blot, c) ácido siálico (AS) en GA, d) glicosaminoglicanos (GAG) en orina. *Resultados:* a) Los GA del grupo Hg sometidos a medio hipotónico mostraron poco cambio de su sección de superficie glomerular (SSG) a diferencia de los C (DSSG%: C(n=7):49±3; Hg(n=5):10.5±0.6), esto indicaría una salida de Alb hacia el medio. b) Las orinas del grupo Hg presentaron un aumento de Alb. Los GA C mostraron una banda de Alb no presente en el grupo Hg. La MBG del grupo Hg mostró un mayor contenido de Fn que el C, las bandas de L no difirieron. c) El contenido de AS en el grupo Hg fue menor que en el grupo C, sugiriendo pérdida de cargas negativas (AS(mg/mg prot): C(n=6):77.9±3.7; Hg(n=5):13.2±0.8). d) Las orinas del grupo Hg mostraron niveles más altos de GAG que el C (GAG (nmol/mg prot): C (n=5): 17.6±1.2; Hg (n=5): 94.8±4.3). *Conclusión:* existe una alteración estructural y funcional de la MBG en la glomerulopatía inducida por HgCl<sub>2</sub> debido probablemente a la pérdida de cargas negativas (GAG y AS).

- 187. Inmunomarcación de  $\alpha$ -SM-actina y TGF $\beta_1$  en tejido renal de rata diabética.** Jorge Toblli, I Stella, M Angerosa, C Nyberg, L Ferder, F Insera

Laboratorio de Medicina Experimental Hospital Alemán & CIMAE, Buenos Aires

El objetivo de este estudio fue valorar la utilidad de la marcación con  $\beta$ -SMA (SMA) y TGF $\beta_1$  como indicadores de fibrogénesis en riñón de ratas con diabetes mellitus (DM) por Streptozotocina (STZ), no controlada. Se utilizaron machos adultos S-D (250-300g) en dos grupos. G1(n=12)Cont. y G2(n= 12)DM. El G2 con STZ 65mg/kg/intraperitoneal, y el G1 vehículo. Mensualmente se controló glucemia (Glu), Creatininemia (Cr) y proteinuria (PrU). Ningún animal recibió insulina. Al 6to. mes se efectuó estudio anatomopatológico (inmunomarcación con anti-SMA y anti-TGF $\beta_1$ ). Según score (0-3) se evaluó: 1) Lesiones Glom. (LG), 2) Tubulointerst.(LTI) y 3) expresión de SMA y TGF $\beta_1$ . *Resultados* (x  $\pm$  SD) Glu (mg/dl) G1: 136,6 $\pm$  4,4; G2: 688,6 $\pm$ 118 (p>0,001); Cr (mg/dl) G1: 0,6 $\pm$ 0,02 G2: 0,9 $\pm$ 0,05 (p>0,001). PrU (mg/día) G1: 2,3 $\pm$ 0,8; G2: 24 $\pm$ 2,1 (p>0,001), LG G1: 0,04 $\pm$ 0,14; G2: 0,96 $\pm$ 0,4 (p>0,001); LTI G1: 0,04 $\pm$ 0,14; G2: 0,33 $\pm$ 0,25 (p>0,001); SMA glom. G1: 0,08 $\pm$  0,19 G2: 1,71 $\pm$ 0,62 (p>0,001); SMA TI G1: 0,04 $\pm$ 0,14; G2: 1 $\pm$  0,33 (p>0,001); TGF $\beta_1$  glom G1: 0,08 $\pm$ 0,19; G2: 1,33 $\pm$ 0,39 (p> 0,001); TGF $\beta_1$  TI G1: 0,17 $\pm$ 0,33; G2: 1,13 $\pm$ 0,38 (p>0,001). Estos datos sugieren la utilidad de la marcación con SMA y TGF $\beta_1$  en el diagnóstico de daño renal incipiente en DM no controlada.

**188. Modificación de fluidez de membrana y de niveles de lipoperoxidación en membranas apicales de riñón isquémico de rata.** Adriana M Torres, Georgina Montagna, CG Hofer

*Farmacología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas UNR, Rosario*

Trabajos anteriores demostraron que la isquemia renal modifica las actividades de enzimas en membranas apicales renales de rata (MAR). El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la isquemia sobre otros parámetros de funcionalidad de MAR. Se trabajó con ratas Wistar macho adultas. Se prepararon MAR a partir de: I) riñones controles (C; n=3), II) riñones extraídos luego de un período de isquemia (clampeo de arteria renal durante 50 minutos, Is, n=3), III) riñones contralaterales del grupo II (CL, n=3). Se determinaron Lipoperoxidación (LPO, pmoles MDA/mg Prot.), Anisotropía (r), Recuperación Proteica (%RP), niveles de Acido Siálico (AS) y de Sulfidrilos Proteicos (SP). Los resultados obtenidos fueron: LPO: (C:  $1.03 \pm 0.26$ , CL  $1.88 \pm 0.64$ , Is:  $3.78 \pm 0.21^*$ ), r: (C:  $0.2003 \pm 0.0014$ , CL:  $0.2010 \pm 0.0018$ , Is:  $0.1819 \pm 0.0022^*$ ) [ $p < 0.05$  vs C]. No se observaron diferencias entre grupos en %RP, AS, y SP. Estos resultados demostrarían que la isquemia renal aumenta los niveles de LPO y la fluidez de membrana en MAR lo que podría condicionar la funcionalidad de proteínas presentes en la membrana. La no modificación de %RP, AS, y SP sería una evidencia preliminar en favor de la no pérdida de unidades proteicas en MAR luego de 50 minutos de isquemia.

**189. Regulación de la expresión y actividad de la Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa (NKA) en la insuficiencia renal crónica (IRC).** Claudia Bertuccio, LF Obika, F Ibarra, J Toledo, Elvira Arrizurieta, RS Martin

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

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que el asa gruesa medular de Henle (mTAL) sufre un proceso adaptativo en la IRC caracterizado por un aumento en el nivel basal de cAMP, probablemente inducido por un aumento de la vasopresina (VS). Con el objeto de investigar si la actividad y la expresión de la NKA están también aumentados en la IRC, se usaron liberación de <sup>32</sup>P y Western blot en membranas y homogenatos, respectivamente, en la médula externa de ratas C y con IRC. Los resultados indicaron que la actividad de NKA en C fue de  $34 \pm 5$  y en IRC de  $53 \pm 7$  mmolPi/mg prot/h ( $p < 0.05$ ) y la densidad óptica (DO/mm<sup>2</sup>) de la banda correspondiente a la subunidad alfa 1 (aprox 110 kDa) fue de  $0,54 \pm 0,08$  en C y de  $0,88 \pm 0,17$  en IRC ( $p < 0,05$ ). Cuando se las trató con OPC 31260 (inhibidor del receptor V2) se observó un cambio no significativo en las IRC a  $1,08 \pm 0,11$  DO/mm<sup>2</sup>. Adicionalmente fue explorada la expresión de NKA en homogenato de corteza de C e IRC, no encontrándose diferencias significativas. Conclusión: en el proceso adaptativo del mTAL en la IRC existe un aumento de la expresión y de la actividad de NKA que parece estar restringida a la médula externa.

**190. Estudio de las alteraciones provocadas por acetaminofeno (APAP) en el epitelio tubular renal.** Laura Trumper, Gabriela Coux, M Mónica Elías.

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

Luego de 16 hs de la administración de APAP (1000 mg/kg p.c., i.p.) a ratas Wistar macho adultas, aparecen alteraciones tubulares. Analizamos los cambios en el epitelio tubular renal a partir del estudio de enzimas marcadoras. Partiendo de homogenados de corteza (H) se obtuvieron membranas basolaterales (BLM) y de ribete en cepillo (BBM). Se consideraron a las fracciones 2 y 3 como representativas de BLM y a 6 y 7 como representativas de BBM. Se realizaron preparaciones con riñones: i) controles (C), ii) intoxicados con APAP durante 1 hora (APAP1h),

iii) intoxicados con APAP durante 16 horas (APAP16h). En BLM, aumentó la actividad de Na,K ATPasa a la hora y disminuyó a las 16 horas (C= $80.8 \pm 5.0$ , APAP1h= $100.9 \pm 7.0^*$ , APAP16h= $62.07 \pm 5.4^*$  mmol Pi/h/mg prot,  $*p < 0.05$ ) En BBM hubo una tendencia a aumentar la actividad en APAP1h. Estos resultados se corroboraron con Western blot. APAP inicialmente provocaría un aumento en la Na,K ATPasa, que se ubicaría en BLM y en BBM, mientras que luego de 16 horas habría una disminución en cantidad y actividad de la enzima que se correlacionaría con las alteraciones funcionales observadas.

**191. Crecimiento renal (CR) y control de la presión arterial media (PAM) en ratas macho (M) y hembra (H). Relación con kalikreina urinaria (KU) FR Ibarra, Elisabet M Oddo, J Toledo, Adriana R Scerbo, RS Martin, Elvira E Arrizurieta.**

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

La función renal decrece con la edad en M y H. La capacidad de crecimiento del tejido renal difiere en M y H. En este trabajo se efectuó uninefrectomía (uNx) en dos grupos (G): A 5 d de vida y B 90 d de vida en M y H, que se estudiaron desde los 60 a los 360d. Se evaluaron peso renal (pr), PAM y KU. El CR remanente, estimado por la relación pr / peso corporal, fue del 84% en M y H del GA y M del GB. Las H del GB tuvieron un CR menor ( $64\% p < 0,02$ ). La PAM mostró valores similares en M y H controles,  $H118 \pm 3,4$  M  $122 \pm 4,6$  mmHg (NS). En uNx, los M mostraron un aumento de la PAM a los 360d:  $135 \pm 3,5$  mmHg vs C,  $p < 0,05$ . En H uNx 150d en A y B la PAM descendió a  $104 \pm 4,5$  mmHg,  $p < 0,05$ . La KU (nkat/gpr) en C no varió entre M y H,  $37 \pm 3$  vs  $33 \pm 3,5$ , NS. En uNx las KU disminuyeron en MA o B  $12 \pm 2,1$  y  $17 \pm 1,9 p < 0,01$ . En las HA o B no variaron,  $22 \pm 3,8$  y  $29 \pm 11,6$  NS. En ratas H GB 150d C y uNx se utilizó aprotinina (APR), inhibidor de K<sub>1</sub> por 4 d. Las C no variaron la PAM pero en uNx la PAM ascendió a  $130 \pm 4 p < 0,01$  vs uNx sin APR. Las ratas H adultas tienen una menor capacidad para regenerar masa renal que las M o H jóvenes. Controlan la PAM elevando la Kalikreina. Estos fenómenos podrían ser regulados por hormonas sexuales.

### CARDIOVASCULAR III HIPERTENSION ARTERIAL

**192. Relación prostaciclina/tromboxano e influencia de la indometacina sobre la contractilidad en el lecho mesentérico de ratas diabéticas.** HA Peredo, Ethel Feleder y Edda Adler-Graschinsky.

*ININFA-CONICET, Buenos Aires*

El objetivo del presente trabajo fué estudiar la producción de prostanoides (PR), así como el efecto de la inhibición de su síntesis con indometacina (IND) sobre la contractilidad de lechos mesentéricos de ratas diabéticas por estreptozotocina (STZ, 60mg/kg), aislados y perfundidos. Se estudió por HPLC la producción de PR liberados al perfusato, 1,2,3,4 y 8 semanas (s) post-STZ. La relación entre la producción de los PR de mayor importancia vascular, prostaciclina y tromboxano, medidos como sus metabolitos estables en ng PR.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> fué en los controles de  $2,2 \pm 0,2$  (n=5). Una semana post-STZ descendió a  $1,0 \pm 0,1$  (n=4,  $p < 0,05$ ). Se mantuvo sin cambios a las 2 y 3 s, y a las 4 s volvió a valores control ( $2,2 \pm 0,7$  n=7), los que se mantuvieron a las 8 s. IND  $10 \mu\text{M}$  redujo en un 50% (n=5,  $p < 0,05$ ) la respuesta contractil a la noradrenalina (NA, 2, 10 y 30 nmoles) en los lechos mesentéricos controles. Este efecto desapareció 1 s post-STZ y reapareció a las 8 s. Se concluye que en el lecho mesentérico la diabetes por STZ provoca una desviación en la producción de PR hacia los vasoconstrictores, así como alteraciones en la regulación de la contractilidad a NA, y que estos cambios tenderían a revertirse en función del tiempo.

**193. Participación del Simpático en el efecto presor del L-NAME.** Andrea Fellet, Andrea Gioffré, MA Cannata\*, Cristina Arranz, Ana M Balaszczuk

*Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, PROSIVAD-CONICET; \*IDNEU*

La inhibición de la síntesis de óxido nítrico (NO) con L-NAME incrementa la presión arterial media (PA). El NO del SNC, podría ejercer un efecto sobre la PA independiente de su acción a nivel de la pared vascular. Estudiamos la participación del simpático en la respuesta presora del L-NAME en ratas anestesiadas. Grupos experimentales: A) L-NAME (5 mg/kg, iv bolus), B) L-NAME (5 mg/kg, iv bolus) luego del bloqueo con Hexametonio (10mg/kg), C) igual que grupo B manteniendo la PA con una infusión iv de Fenilefrina (F) (4-6µg/kg/min), D) F (6µg/kg, iv bolus). Se evaluó PA, Frecuencia Cardíaca (FC),  $\Delta FC/\Delta PA$  (sensibilidad del reflejo; S). Resultados: Grupo A: S = 0,73±0,05, (n=5); Grupo B: S = 0,10±0,01\*, (n=5); Grupo C: S = 0,50±0,05\*\*, (n=6); Grupo D: S = 1,7±0,1\*, (n=5), \* p<0,05 vs. A, \*\*p<0,05 vs B. En todos los grupos el aumento de PA fue igual y la bradicardia observada se suprimió en el grupo B, en el cuál la PA luego del L-NAME fue inferior al umbral del reflejo. La S en el grupo A, a igual aumento de la PA, fue menor a la del grupo D. Concluimos: 1) el aumento de PA y la bradicardia refleja generada con L-NAME es independiente de la integridad del Simpático, 2) la respuesta refleja ante el aumento de PA con L-NAME es diferente a la observada con F.

**194. Depresión de la respuesta a la noradrenalina (NA) en aorta aislada de ratas diabéticas por administración de estreptozotocina (STZ).** GJ Rinaldi, A Rebolledo, Verónica Milesi, Alicia Gómez Alvis, Angela Grassi

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

Basados en experiencias previas donde hallamos aumento de la respuesta rápida a NA en aortas de ratas diabéticas (DI), estudiamos simultáneamente la contracción (mg de fuerza por mg de tejido) y el contenido de Ca (captación de  $^{45}Ca$ , nmoles/mg de tejido) inducidos por NA 0.1 µM en anillos de aortas de ratas DI (STZ I.P 60 mg/kg, n=7) y controles (CO, vehículo I.P., n=8). A los 3 min. del agregado de NA la contracción fue de: CO= 0.78 ± 0.06, DI= 0.61 ± 0.08 (NS); y el  $^{45}Ca$  de: CO= 0.93 ± 0.03, DI= 0.71 ± 0.04 (P<0.05, test de t). A los 10 min. la contracción fue de: CO= 1.04 ± 0.08, DI= 0.70 ± 0.11 (P<0.05); y el  $^{45}Ca$  de: CO= 1.04 ± 0.06, DI= 0.57 ± 0.11 (P<0.05). Se concluye que: 1) En aortas de ratas DI la captación de  $^{45}Ca$  en presencia de NA esta disminuida, 2) Esta disminución coexiste con una menor fuerza contráctil en DI a los 10 min., 3) La fuerza no disminuida en DI a los 3 min. con menor captación de  $Ca^{2+}$  podría deberse a que en esta etapa la contracción se debe predominantemente a liberación de  $Ca^{2+}$  de depósitos intracelulares.

**195. El GMPc mimetiza el efecto del Péptido Auricular Natriurético (ANP) sobre la Óxido Nítrico sintetasa (NOS).** L González Bosc\*, M Costa\*\*, M Majowicz\*, N Vidal\*, A Balaszczuk\*\*, C Arranz\*\*

*\*Biología Celular e Histología, \*\*Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, PROSIVAD-CONICET, Buenos Aires*

El ANP estimula la NADPH-diaforasa (NADPH-d), marcadora de la actividad de NOS, en el endotelio vascular y en el epitelio del intestino delgado (ID) y colon (C) de rata, tanto *in vivo* como *in vitro*. Este aumento de actividad se previene con L-NAME. Para evaluar si el subgrupo de receptores tipo A o B del ANP, acoplado a guanilato ciclasa, estaba relacionado con el aumento de la NADPH-d inducida por el ANP, se incubaron segmentos de aorta, ID y C de rata en Krebs sin y con 0.1 mM de 8-Br-GMPc durante 15 minutos a 37°C. Se determinó histoquímicamente la ac-

tividad NADPH-d sobre los tejidos. Luego se observaron los cortes, se les midió la densidad óptica (DO) y se fotografiaron las secciones con un microscopio Zeiss Axiophot. DO del endotelio de aorta: 0.192±0.010 vs 0.255±0.009\*\*\*; músculo de aorta: 0.132±0.003 vs 0.145±0.003\*\*; endotelio de arteriolas de ID y C: 0.242±0.007 vs 0.264±0.004\*; enterocitos ID: 0.16±0.01 vs 0.272±0.005\*\*; enterocitos C: 0.187±0.003 vs 0.238±0.004\*\*\*. Estos resultados muestran que el 8-Br-GMPc mimetiza el efecto del ANP sobre el endotelio vascular y el epitelio de ID y C. Esto sugiere que la interacción del ANP con los receptores A o B aumenta la concentración intracitoplasmática de GMPc, lo cual provocaría la estimulación de la NOS aumentando la producción de NO. Marumo y col. (1995) encontraron resultados similares, concluyendo que la estimulación de la NOS está mediada, al menos en parte, por la activación de una proteínquinasa dependiente de GMPc. \*p<0.01, \*\*p<0.001, \*\*\*p<0.0001 vs. Control (n=20).

**196. Alteraciones morfológicas en tejido cavernoso de ratas SHR.** Jorge Toblli, O Mazza, I Stella, L Ferder, F Inserra

*Laboratorio de Medicina Experimental, Hospital Alemán & CIMAE, Buenos Aires*

La disfunción eréctil en pacientes hipertensos no ha definido aun un patrón estructuralmente aceptado. Nuestro objetivo fue evaluar las alteraciones morfológicas de los cuerpos cavernosos (CC) en ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Se utilizaron machos endocriados SHR (n= 15) y control normotenso WKY (n= 15) de 6 semanas. Se registró presión arterial sistólica (PAS) mediante "tail-cuff" mensualmente. Al 8ºmes se sacrificaron todos los animales para el estudio histológico de los CC. Se realizó la tinción de Masson y monoclonal anti-SMA (SMA). Se evaluó las alteraciones con los índices: a) Proliferación de músculo liso cavernoso (MLC) y vascular (MLV), 1=normal; 2=lev; 3=mod; 4=sev. b) Fibrosis, 0=aus, 1=lev; 2=mod; 3=sev; 4=muy sev. Resultados (X±DS): 1) PAS(mmHg) SHR 179,3± 14,3; WKY 119,6± 2,4 (p<0,001). 2) SMA-CC SHR 2,7± 1,1; WKY 1,1± 0,3 (p<0,001). 3) Fibrosis-CC SHR 2,8± 1,1; WKY 0,1± 0,3 (p<0,001). 4) SMA-MLV SHR 2,7± 1; WKY 1± 0,2 (p<0,001). El grupo SHR presentó correlación positiva entre PAS y SMA-CC (r= 0,9036); PAS y Fibrosis-CC (r=0,9631); PAS y SMA-MLV (r=0,9294). Conclusión: estos hallazgos muestran en las ratas SHR un patrón proliferativo en MLV, MLC y mayor fibrosis en CC que acompañan en forma paralela el grado de hipertensión arterial.

**197. El glicerol facilita la hipertension arterial por fructosa en la rata.** PF Damiano\* MI Rosón\*, I Armando\*, LE Albornoz\*, E Dasca\*, P Werba\*, L Cuniberti\*, A Ferrero\* e IJ de la Riva\*

*\*Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina; UBA; \*Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Hospital de Niños R. Gutiérrez; \*Fundación Favaloro.*

La dieta enriquecida en fructosa determina hipertensión y alteraciones metabólicas. Postulamos el aumento del diacilglicerol que estimularía la PKC y la contractilidad vascular. Se estudiaron ratas Sprague Dawley (machos, 180 g) en 4 grupos: 1) C (n=11), dieta estándar y agua; 2) G (11) dieta estándar y glicerol 5% en agua; 3) F (11), fructosa 55% de la dieta y agua; 4) FG (11), fructosa 55% y glicerol 5% en agua. Se registró PA indirecta: a la 2ª semana todos los FG eran hipertensos (149±2 vs C 128±2 mmHg, p<0.001); en el grupo F, 6 hipertensos y 5 normotensos (151±3 vs 130±2 mmHg, p<0.001). No hubo diferencias en la glucemia. La trigliceridemia fue mayor en FG vs C (256±42 vs 160±8 mg%, p<0,05). La aorta torácica no mostró tono basal apreciable con nitroprusiato *in vitro*. La respuesta al éster de forbol (5.10<sup>-7</sup>M PDBu) fue mayor en G (n=4, 2629±770 mg) y FG (n=5, 2251±528 mg) vs C (n=4, 118±72 mg, p<0,05). Conclusión: el glicerol favorece la hipertensión fructosa-dependiente; el efecto podría estar vinculado a una mayor actividad PKC.

## INTERDISCIPLINARIA

198. El incremento de la frecuencia y de la masa de LH secretada por pulso se acompaña de un marcado desorden de la liberación de LH en adolescentes con poliquistosis ovárica (PCO). Gabriela Ropelato, Cecilia García Rudaz, JD Veldhuis\*, María Escobar, Marta Barontini

Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Hospital de Niños R. Gutiérrez, Buenos Aires; \*Health Sciences Center, University of Virginia, USA.

Se estudiaron las características de la secreción espontánea de LH en 12 adolescentes con PCO y 11 adolescentes eumenorreicas en fase folicular temprana con similar edad cronológica. Se obtuvieron muestras de sangre cada 20 min. durante 12 h. (7pm-7am). Se determinó la concentración de LH por IFMA (LHspec, DELFIA). Las propiedades de la secreción espontánea (tasa de producción; TP, masa secretada por pulso: masa, vida media de LH:  $t_{1/2}$ , entropía aproximada: Ap En, para estimar el grado de desorden de la secreción) fueron evaluadas con análisis de deconvolución. A las 7 am se determinó además la concentración en plasma de androstenediona (A), testosterona (T), 17 OH-progesterona (17-OHP), estradiol (E2) por RIA y SHBG por capacidad de unión a DHT. Las pacientes con PCO presentaron un incremento significativo ( $p < 0.005$ ) en los niveles de 17OHP, A, T y una disminución significativa ( $p < 0.005$ ) en los niveles de SHBG. Los niveles de E2 fueron similares en ambos grupos. El grupo PCO mostró un incremento significativo de la concentración media de LH ( $p < 0.001$ ), de la TP ( $p < 0.001$ ), de la masa ( $p < 0.05$ ) de la frecuencia de pulsos ( $p < 0.05$ ), del  $t_{1/2}$  ( $p < 0.01$ ) y un mayor grado de desorden ( $p < 0.002$ ) comparado con las controles. Este trabajo demuestra por primera vez que en el síndrome de PCO se secretan moléculas de LH de vida media prolongada y la liberación espontánea de LH ocurre con un patrón más irregular que el de las adolescentes eumenorreicas. Un aumento en el nivel basal (no-pulsátil) de la liberación de LH, isoformas más básicas y/o la asimetría del pulso secretorio podrían determinar una prolongación del  $t_{1/2}$ . Si el aumento en la TP, la masa liberada por pulso y el  $t_{1/2}$  de LH son causa o consecuencia de la excesiva secreción de andrógenos debe aún ser determinado.

199. Participación de los depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$  sensibles a tapsigargina y de los canales dependientes de voltaje (CCDV) en la movilización de  $Ca^{2+}$ , inducida por angiotensina (All) en células hipofisarias normales e hiperplásicas. A. González Iglesias, G. Díaz-Torga, V. Lux-Lantos, C. Libertun, D. Becú-Villalobos

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires

Los estrógenos inducen hiperplasia de hipofisaria y alteran el mecanismo de acción de All en lactotrofos. Para evaluar dicha alteración, investigamos la respuesta de  $Ca^{2+}$  a All en células hipofisarias normales (C) en comparación con células de un tumor hipofisario inducido *in vivo* por dietilestilbestrol (T). Observamos que en células T All (10-8M) inducía un influjo de  $Ca^{2+}$  externo que era inhibido en un 50±3% por a) ausencia de calcio extracelular, b) bloqueantes de CCVD, y, totalmente por c) despolarización con  $K^+$  (25mM). La depleción de los reservorios internos de calcio con tapsigargina (0.5 y 2  $\mu$ M), inhibió completamente la respuesta de calcio a All en C, y parcialmente en T. La producción de  $^3H$ -IP3 por All (10-10M) fue menor en células T. Concluimos que en células T la baja producción de IP3 mueve una movilización inicial de  $Ca^{2+}$  atenuada en comparación

con células C, mientras que se observa la fase posterior, que depende del influjo de  $Ca^{2+}$  extracelular mediado de manera importante pero no exclusiva por los CCVD.

200. Rol de la  $3\beta$  hidroxisteroide dehidrogenasa ( $3\beta$  HSD) en la síntesis de andrógenos en la adrenal humana. Andrea Dardis, N Saraco, E Berensztein, MA Rivarola, A Belgorosky

Laboratorio Investigación, Hospital de Niños J.P. Garrahan, Buenos Aires

La adrenalectomía se caracteriza por el aumento de secreción de andrógenos adrenales. Ocurre entre los 6-8 años de edad en humanos. Con el objetivo de evaluar el posible rol regulatorio de la  $3\beta$ HSD en la síntesis de andrógenos en la adrenal humana, se analizó la abundancia del RNAm de  $3\beta$ HSD (Dot blot y RT-PCR semicuantitativa(S)) en 11 tejidos adrenales humanos normales en dos grupos (Gr) de edades, Gr1: <8 años (a) (n=6, r: 0,1-2,48) y Gr2:  $\geq 8$ a (n=5, r: 8-13); en tejido de un tumor adrenal con Síndrome de Cushing (TSC) y de 2 T virilizantes (TV) y en células adrenales del TSC y 1 TV al 3er día de cultivo (basal y con ACTH e IGF-1). El RNAm de  $3\beta$ HSD fue más alto en el Gr1 que en el Gr2 (Dot blot:  $4.65 \pm 2.7$  y  $0.28 \pm 0.27$  UA,  $p = 0.006$ ; RT-PCR:  $21.5 \pm 12.5$  y  $6.77 \pm 3.78$  UA,  $p = 0.039$  resp). En el tejido TSC ( $8.74 \pm 1.74$ ) fue más alto que en los TV ( $0.47 \pm 0.02$ ,  $0.87 \pm 0.08$ )  $p = 0.001$ . En cultivo del TSC el RNAm basal ( $0.82 \pm 0.1$ ) disminuyó con ACTH ( $0.55 \pm 0.06$ ),  $p = 0.005$  y se incrementó con IGF-1 ( $2.36 \pm 0.07$ )  $p = 0.006$ . En el TV no hubo cambios. Al 3er día de cultivo la DHEAS y androstenediona basales fueron en TV  $1170 \pm 210$  y  $335 \pm 29$ , TSC  $17.1 \pm 3.5$  y  $73.7 \pm 11.7$  pmol/10<sup>6</sup> células. 24hs respectivamente y se incrementaron bajo ACTH en TV ( $2006 \pm 360$  y  $525 \pm 76$ ) y en TSC ( $29.8 \pm 5.4$  y  $36.7 \pm 12.9$ )  $p < 0.05$  y disminuyeron con IGF-1 solo en TSC ( $7.86 \pm 2.4$  y  $43.7 \pm 6.1$ )  $p < 0.05$ . Estos datos sugieren que la adrenalectomía humana podría ser secundaria a una disminución de la abundancia del RNAm de  $3\beta$  HSD. El hecho de que bajo ACTH aumenta la secreción de andrógenos y disminuye el RNAm de  $3\beta$ HSD, mientras que el IGF-1 ejerce un efecto inverso, aporta nuevas evidencias del rol regulador ejercido por la  $3\beta$ HSD en la síntesis de andrógenos adrenales.

201. Efecto del óxido nítrico (NO) sobre la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) en células adenohipofisarias de rata. M Velardez\*, A González Iglesias\*\*, Susana Theas\*, Adriana Seilicovich\*, Damasia Becú de Villalobos\*\*, Beatriz H. Duvilanski\*.

\* Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Buenos Aires; \*\* IByME-CONICET, Buenos Aires

Previamente hemos observado que el nitroprusiato de sodio (NP) tiene un efecto inhibitorio inmediato sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  en células monodispersas de adenohipofisis. En el presente trabajo, investigamos el mecanismo por el cual el NO afecta la  $[Ca^{2+}]_i$ , determinada por espectrofluorometría utilizando Fura-2. En un medio sin  $Ca^{2+}$ , el NP (1 mM) no produjo la disminución inmediata, pero indujo un aumento tardío de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Control:  $109.3 \pm 19.1$  nM; NP:  $137.6 \pm 2.0$ ,  $p < 0.05$ ). El verapamil (10  $\mu$ M), bloqueante de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje (VDCC), atenuó el efecto inhibitorio temprano del NP sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  (Control:  $228.3 \pm 8.1$  nM; NP:  $207.3 \pm 1.4$ ,  $p < 0.05$ ; Verapamil:  $193.2 \pm 7.2$ ; NP + Verapamil:  $183.3 \pm 1.9$ ,  $p < 0.05$ ). La tapsigargina (2  $\mu$ M), inhibidor de la  $Ca^{2+}$ /ATPasa de retículo endoplásmico, no modificó el efecto temprano pero disminuyó el efecto tardío del NP. Estos resultados indican que el NO tiene un efecto bifásico sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  en células adenohipofisarias, actuando sobre VDCC y depósitos intracelulares de calcio sensibles a tapsigargina.

## RESUMENES DE LAS COMUNICACIONES EN POSTERS

## POSTERS I

## INMUNOLOGIA BASICA Y CLINICA

- 202. Alteraciones en las células CD4+ y CD8+ en los órganos linfáticos periféricos en ratones mutantes *nack*.** Gabriela Lombardi, J De Almeida, Virginia Francisco, P. Bekinschtein, Isabel Piazzon, Christiane Dosne Pasqualini, Irene Nepomnaschy.

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

Habiendo demostrado la existencia de una disminución en el número de células CD4+ y el aumento de las células CD8+ en el timo de los ratones *nack* (n/n), investigamos cómo se reflejaban dichas alteraciones en los ganglios y en el bazo utilizando técnicas citofluorométricas, en ratones libres de gérmenes. Los resultados obtenidos (media del N° de células ± DS(n) (x10<sup>6</sup>)) fueron: en el bazo el N° de células CD4+ fue de 11.0±6(4) en los ratones n/n vs 27.9±3.1(3) en los hermanos n/+ (p<0.01); las células CD8+ estaban aumentadas: n/n 16.0±3.5(3) vs n/+ 7.3±0.6(3) p<0.01. En los ganglios el número de células CD4+ no difirió significativamente entre ambos grupos (n/n. 2.5±0.6(3) y n/+ :3.4±1.7(7) mientras que el de la subpoblación CD8+ se mantuvo elevado (n/n: 3.7±1.5(5) vs n/+ :1.2±0.7(5) p<0.02). No se observaron diferencias en el número de células B IgG+ ni en ganglios ni en bazo. Los resultados indican que, a pesar de la marcada disminución de las células CD4+ en timo, sangre y bazo, su número no difiere significativamente de los valores normales en los ganglios. Se discute la posible participación de fenómenos de migración diferencial y/o proliferación en la normalización del número de las células CD4+ observada en los ganglios de estos mutantes.

- 203. Alteraciones en la maduración tímica en los ratones mutantes *nack*.** Virginia Francisco, J de Almeida, Gabriela Lombardi, Paula Berguer, Isabel Piazzon, Christiane Dosne Pasqualini, Irene Nepomnaschy

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

Los ratones *nack* (n/n) presentan un descenso marcado en el % de células CD4+ en timo y periferia. Se investigó en ratones n/n y hermanos n/+ libres de gérmenes el número absoluto de las subpoblaciones CD4+ y CD8+ tímicas y en qué estadio madurativo se detectaban alteraciones en las mismas. Mediante técnicas citofluorométricas se obtuvieron los siguientes resultados: (media del N° de células ± DS (n) (x10<sup>6</sup>)/lóbulo tímico): CD4+: n/n 1.06±0.15(3) vs n/+ 3.9±0.36(3)\* y CD8+: n/n 3.1±0.31(3) vs n/+ 1.15±0.15(3)\*. El N° de células CD4+ CD8- dentro de las subpoblaciones 1) ThB+; 2) ThB-; 3) CD24<sup>hi</sup>; 4) CD24<sup>lo</sup>, fue (n/n vs n/+): 1) 0.14±0.01(3) vs 0.32±0.03(3)\*; 2) 0.98±0.33(3) vs 3.72±0.43(3)\*; 3) 0.73±0.08(3) vs 2.3±0.1(3)\*; 4) 0.24±0.02(3) vs 0.93±0.04(3)\* (\*: p<0.01). Se observó además un aumento significativo de las células CD4+CD8+ en la médula (ThB-) y en la población más madura que expresa una baja densidad del marcador CD24. Los resultados obtenidos muestran un aumento significativo en el número de timocitos CD8+ y una disminución de la subpoblación CD4+. Esta disminución comenzaría en estadios madurativos tempranos ya que se detecta en los timocitos de la corteza y en aquellos que expresan una alta densidad del marcador CD24.

- 204. Participación de la IL-10, IL-15 y TNF en el crecimiento autónomo de células leucémicas murinas.** MJ Gravisaco, C Waldner, C Mongini, M Pasetti\*, M Tanner\*, M Sánchez L., S Hajos, E Alvarez

*Cátedra de Inmunología - IDEHU, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; \*Center for Vaccine Development, University of Maryland, USA.*

El modelo tumoral murino LB es una leucemia T de origen espontáneo y a partir de ella se ha establecido la línea de cultivo LBC. El objetivo de este trabajo es analizar tanto la expresión génica como la producción intracitoplasmática de las siguientes citoquinas: IL-2, IL-10, IL-15 y TNF. Por RT-PCR se observó la expresión de los ARNm de estas citoquinas en ambos tipos celulares. Por citometría de flujo intracitoplasmática demostramos la expresión proteica, en las células LB y LBC respectivamente, de: IL-10 : 0 y 27%, TNF :25 y 10%, IL-2 : 26 y 32%, IL-15 : 0 y 17%. Cuando se realizaron cultivos *in vitro* de ambas células en presencia de anticuerpos neutralizantes anti-IL-2, anti-IL-10, anti-IL-15 y anti-TNF no se observó modificación alguna de la capacidad proliferativa de las mismas, salvo un aumento de un 90% de las células LB en presencia de anticuerpos anti-IL-15. Los resultados obtenidos indicarían que la IL-10 y el TNF no ejercerían ningún efecto autócrino sobre la proliferación mientras que la IL-15 ejercería un efecto inhibitorio que normalmente sería compensado por otras citoquinas, como la IL-2.

- 205. Caracterización parcial de Medio Condicionado de Placenta Humana (MCPH).** Cecilia Greco, A Vivas y M Koncurat.

*Laboratorio de Inmunología y Microscopía Electrónica Universidad Nacional de Río Cuarto*

En la comunicación del feto con su madre tienen fundamental importancia sustancias producidas por la placenta. Desde hace varios años producimos MCPH e investigamos su acción biológica sobre linfocitos, por ello el objetivo de este trabajo fue caracterizar parcialmente dichos extractos. Se obtuvieron 10 MCPH procesando placentas normales a término, cedidas por el Servicio de Toco-Ginecología del Hospital Central de Río Cuarto, por el método de Koncurat et al. Se analizó el patrón proteico por SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes; se cuantificaron IL-2 e IL-4 por ELISA y P4, β hCG, E2, T, PRL, LH y FSH, por RIA. Los extractos contienen 7,59 ± 0,23 mg/ml de proteínas. La [IL-4] fue de 8,44 ± 1,85 pg/ml; siendo la IL-2 no dosable. Las concentraciones de P4 (19,2 ± 9,04 ng/ml), E2 (1,92 ± 0,92 ng/ml) y β hCG (0,302 ± 0,18 UI/ml) son semejantes a los valores séricos previstos para mujeres en 1er trimestre de gestación. Nuestros extractos contienen concentraciones muy pequeñas de LH y FSH, siendo la T no dosable. Las concentraciones de P4, β hCG e IL-4, producidas por las células placentarias cultivadas *in vitro* y presentes en los MCPH, explicaría la acción inmunomoduladora de estos extractos.

- 206. Bilirrubina no conjugada (BNC) interacciona con el componente C1 del sistema del complemento (C).** Sandra M Arriaga, AD Mottino, Adriana M Almará

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

Previamente encontramos que BNC inhibe la actividad hemolítica de la vía clásica del C. El objetivo de este trabajo fue com-

probar el efecto de BNC sobre el componente C1. Mediante un ensayo funcional se evaluó en primer lugar la capacidad de C1 para inhibir la transformación de eritrocitos de carnero sensibilizados (EA) en EAC1, en ausencia (control) y presencia de BNC (8 mg/dl). Luego del agregado de BNC se observó un 55±21% de reducción de la hemólisis con respecto al control ( $p < 0.05$ ). Para verificar la participación de C1q en este efecto se desarrolló un sistema de ELISA y se evaluó la capacidad del pigmento para inhibir la fijación de C1q a IgG humana inmovilizada en tiras de poliestireno. Los % de inhibición obtenidos para BNC 2, 4, 8, 12 y 16 mg/dl ( $n=3$ ) fueron respectivamente: 8±13; 13±14; 39±9; 59±6; 54±8\* (\*)  $p < 0.01$  vs. control (sin BNC). Los resultados indicarían que BNC interacciona con el componente C1 a través de C1q. Este efecto del pigmento sugiere una implicancia de la hiperbilirrubinemia en los mecanismos inmunitarios dependientes de anticuerpos.

**207. Proteínas de membrana de glóbulos rojos humanos estabilizados y adicionados con vitamina E.** María Alejandra Fernández Alberti<sup>1,2</sup>, N.E. Fink<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>CONICET, <sup>2</sup>Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata

Se estudiaron las alteraciones de las proteínas de membrana de glóbulos rojos estabilizados (GRE) con aldehídos y adicionados con vitamina E (60, 90, 120, 240 y 300 µg/L). Se realizaron electroforesis en PAGE-SDS de los *ghosts* obtenidos en diferentes períodos de almacenamiento. En sangre fresca, por densitometría, se obtuvieron las siguientes áreas: Espectrina (Spt): 29,0%; banda 2.1: 4,3%; banda 3: 24,6%; banda 4.1: 5,2%; banda 4.2: 5,5%; banda 5: 2,9% y banda 6: 12,3%. Al día 1 de estabilización aparecen bandas de mayor PM que Spt en todas las muestras, correspondiendo el área de polímeros a un 10% del total y se observó una disminución del 10% en la relación Spt/banda 3. Al cabo de 20 días aparecen varias bandas de bajo PM y la relación Spt/banda 3 aumenta hasta 190% del valor inicial. La vitamina E no impidió la formación de los polímeros ni la aparición de bandas de menor PM. El agregado de 300 µg/L de vitamina E provocó un menor incremento (40%) en la relación Spt/banda 3 a los 20 días. Se concluye que las alteraciones en la membrana del GRE que aparecen durante el almacenamiento se corrigen parcialmente por el agregado de vitamina E.

**208. Ratones NOD (non-obese diabetic) de edad avanzada desarrollan espontáneamente prostatitis autoinmune.** M Maccioni\*, AC Donadio\*, VE Rivero\*, M Depiante-Depaoli†, C Carnaud#, CM Riera\*

\*Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba; #U-25-INSERM† -Hospital Necker, Paris, Francia

La cepa de ratones NOD (non-obese diabetic) desarrolla espontáneamente diabetes autoinmune y presenta reacciones autoinmunes similares en tiroides, paratiroides, glándulas adrenales y glándulas salivales. En el presente trabajo analizamos si ratones NOD de 40 semanas de edad presentan espontáneamente prostatitis autoinmune. La lesión en próstata se evaluó en forma semicuantitativa analizando cortes histológicos coloreados con hematoxilina-eosina. Ratones NOD de 8 semanas de edad no presentaron alteraciones histológicas en próstata, mientras que se observó infiltración mononuclear espontánea en 6/9 animales de edad avanzada. Esta fué de grado leve en un caso, moderada en 3 casos y severa en los 2 casos restantes. El estudio de la respuesta autoinmune humoral por ELISA reveló que los sueros de animales jóvenes no presentan niveles de IgG anti-antígenos prostáticos de ratón (DO: 0.195 ± 0.106,  $n=8$ ), mientras que el 55% de los animales de edad avanzada estudiados ( $n=11$ ) presentaron niveles altos de IgG específica (DO: 1.026 ± 0.330), siendo IgG2b el principal isotipo involucrado. Paralelamente, se pudo comprobar que el 73% de los sueros de los animales de 40 semanas, reaccionaron con Prostateína, uno de los principales autoantígenos prostáticos en rata. (DO: 0.153 ± 0.087)

, no así los sueros de los animales jóvenes (DO: 0.040 ± 0.008,  $n=11$  en ambos casos).

**209. Importancia de genes no-MHC en la inducción de prostatitis autoinmune experimental.** V Rivero\*, M Depiante\*\*, C Carnaud\*\*, CM Riera\*

\*Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional Córdoba, \*\*U-25-INSERM-Hospital Necker, Paris, Francia.

Ratones de la cepa NOD desarrollan diabetes tipo 1 como consecuencia de una insulinitis autoinmune espontánea. En trabajos anteriores hemos inducido prostatitis autoinmune experimental (PAE) en la cepa NOD por medio de la inmunización de ratones machos adultos con extracto de glándulas accesorias masculinas de rata (GAM) incorporado a adyuvante de Freund completo (CFA). En el presente trabajo analizamos el impacto del *background* genético NOD sobre la susceptibilidad a desarrollar PAE. Ratones NOD (H2<sup>97</sup>) y ratones B6/H2<sup>97</sup> (ratones de la cepa C57BL6 que expresan antígenos de histocompatibilidad de la cepa NOD) fueron inmunizados con GAM-CFA. El porcentaje de ratones con lesiones histológicas fue significativamente menor en la cepa B6/H2<sup>97</sup> cuando se comparó con el observado en los ratones de la cepa NOD ( $p < 0.05$ ). Con respecto a la severidad de las lesiones histológicas se observaron infiltrados menos severos en los animales de la cepa B6/H2<sup>97</sup>. Ensayos linfoproliferativos demostraron presencia de células T autoinmunes en ambas cepas, pero nuevamente con mayor intensidad en la cepa NOD. Cuando se analizó la presencia de autoanticuerpos no se encontraron diferencias significativas. Estos resultados demuestran que el *background* genético NOD determina la severidad de la PAE e intensidad de la respuesta de células T generadas por GAM. Nuestros resultados apoyan la idea de que genes no-MHC de la cepa NOD favorecen las manifestaciones autoinmunes severas observadas en esta cepa.

**210. Efecto inmunosupresor de Prostateína (PR) sobre células del sistema inmunocompetente.** M Maccioni, CM Riera, VE Rivero

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional Córdoba

Prostateína (PR) es la proteína más abundante en próstata ventral de rata de donde es secretada al fluido seminal. Pertenece a la familia de las uteroglobinas y su función biológica no se conoce. Debido a que el fluido seminal tiene un fuerte efecto inmunosupresor y al hecho de que uteroglobina posee actividad antiinflamatoria, se decidió investigar el efecto de PR sobre células del sistema inmune. Se observó que PR purificada inhibe la respuesta proliferativa de células mononucleares de bazo (CMB) de rata frente a mitógenos inespecíficos (Con A y PHA) en forma específica y dosis dependiente (83, 49 y 17% de inhibición para 150, 75 y 37.5 µg/ml de PR). Esto no se debe a un efecto citotóxico directo, ya que las células se mantienen viables, según el test de exclusión con Azul de Trypan y un ensayo colorimétrico de medición enzimática. PR también inhibe la secreción de IL2 en los sobrenadantes de cultivo (65 y 35 % de inhibición para 150 y 75 µg/ml de PR) y la expresión del receptor de IL2 estudiada por citometría de flujo. Este efecto inhibitorio también se observó en ensayos de proliferación con células de ratón y humanos; aún más PR fue capaz de inhibir en forma dosis dependiente cultivos mezcla linfocitario de células mononucleares humanos

**211. Comportamiento de la respuesta inmune humoral en ratas Wistar de 12 meses de edad.** V Gabriel Morón, B Maletto, A Rópolo, MC Pistoresi-Palencia

Facultad de Ciencias Químicas, UNC Córdoba

Durante el desarrollo de Prostatitis Autoinmune Experimental (PAE), ratas Wistar de 12 meses de edad (12m) presentan una mayor respuesta autoinmune celular y menor respuesta humoral

(tanto IgM e IgG) contra componentes prostáticos (GA) en comparación con ratas de 3 meses (3m). En ratas de 12m normales se observó disminución de la respuesta proliferativa de linfocitos T frente a ConA ( $p < 0,01$ ) y aumento de anticuerpos naturales (tipo IgM e IgG). Durante este período se comenzaron los estudios orientados hacia el conocimiento de los mecanismos que afectan a la respuesta inmune humoral en ratas de 12m. Para ello se estudió la respuesta proliferativa de células mononucleares de bazo de ratas normales frente a LPS (5  $\mu\text{g/ml}$ ) no observándose diferencias entre ambas edades. La inmunización de ratas de 12m (n:6) con un heteroantígeno (OVA/CFA), permitió observar disminución de la respuesta inmune celular, medida por DTH ( $p < 0,009$ ), y que los niveles de anticuerpos específicos (IgM e IgG) no mostraron diferencias con respecto a las de 3m inmunes (n:6). Cuando en órganos linfáticos de ratas de 12m (n:6) con PAE se midieron las células B productoras de anticuerpos de tipo IgG específicas para GA por ELISPOT no se encontró diferencias con las detectadas en ratas de 3m con PAE. Estos resultados nos permiten observar que las ratas de 12 meses presentan tanto en PAE como en la respuesta a OVA un comportamiento diferencial entre la respuesta inmune celular y humoral. Para continuar estos estudios en las ratas con PAE se proyecta analizar la cooperación entre linfocito T y B a los fines de analizar su participación en la disminución de la producción de anticuerpos observada en los animales de 12m.

**212. Sistema inmune y envejecimiento: Participación de las células de Ganglio Linfático en la captación de un autoantígeno.** Andrea Rópolo, VG Morón, B Maletto, MC Pistoresi-Palencia

*Facultad de Ciencias Químicas, UNC, Córdoba*

Teniendo en cuenta los hallazgos del deterioro de la respuesta inmune humoral en ratas Wistar de 12 meses (12m) con Prostatitis Autoinmune Experimental (PAE) y del compromiso de las células presentadoras de antígenos en este modelo experimental, se comenzaron a estudiar los eventos tempranos en la inducción de esta respuesta autoinmune. La inyección de GA (componentes prostáticos que constituyen el/los antígeno(s) inductores de PAE) marcado con FITC (GA-FITC) en animales normales permitió observar que la localización del GA-FITC en el ganglio linfático drenante no mostraba diferencias en la localización ni en el tiempo de llegada del antígeno entre ratas de 3 y 12m de edad. Por microscopía confocal observamos células conteniendo el antígeno en su citoplasma. Continuando con estos estudios, ratas de 3 y 12m (n:8) fueron inyectadas con GA-FITC. Mediante microscopía de fluorescencia observamos en los homogenatos de ganglios drenantes células de gran tamaño marcadas con el antígeno. La citometría de flujo corroboró la presencia de células fluorescentes, e identificamos dos poblaciones: células pequeñas, no granulares con baja intensidad de fluorescencia, y células de mayor tamaño y más granulares, con mayor intensidad de fluorescencia. Se observó que el 64% en ratas de 3m y el 46% en las de 12m correspondían a células pequeñas-no granulares fluorescentes. Observamos que en los animales de 12m la población fluorescente de mayor tamaño y más granular correspondía a un 14% de la población total, mientras que en los de 3m sólo un 7% presentaba fluorescencia. Esta diferencia observada en la marcación de distintas poblaciones celulares señala un comportamiento diferente en los animales envejecidos y hace necesario continuar estos estudios con el análisis fenotípico de las poblaciones comprometidas en este fenómeno.

**213. Modulación de la respuesta inmune en animales envejecidos: Influencia de adyuvantes.** Belkys Maletto, VG Morón, A Rópolo, MC Pistoresi-Palencia

*Facultad de Ciencias Químicas, UNC Córdoba*

La respuesta inmune a antígenos exógenos y a autoantígenos en animales de 12 meses (12m) difiere cuantitativamente de la observada en los de 3 meses (3m). El objetivo de este trabajo fue comenzar a estudiar la modulación de la respuesta inmune en animales de 12m utilizando como antígeno OVA incorporada en dife-

rentes adyuvantes. Ratonas BALB/c de 3m (n:6) y 12m (n:7) se inmunizaron s.c. con 25  $\mu\text{g}$  de OVA (día 0) y con 10  $\mu\text{g}$  el día 15 en Bordetella pertussis (OVA-Bp) o en CFA (OVA-CFA). El grupo control se inyectó con OVA-PBS. Los niveles de IgM e IgG fueron menores en los animales de 12m que en los de 3m con ambos adyuvantes (para OVA-Bp: IgM  $p < 0,0004$ , IgG  $p < 0,006$  y para OVA-CFA: IgG  $p < 0,02$ , IgM fue NS). Los niveles de IgM e IgG en el día 28 en animales de 3m inyectados con ambos adyuvantes fueron mayores que en el grupo OVA-PBS (Bp vs PBS:  $p < 0,005$ ; CFA vs PBS:  $p < 0,005$ ). En los animales de 12m la inyección de OVA-CFA no modificó los niveles de IgM específica pero sí elevó los niveles de IgG en comparación de OVA-PBS ( $p < 0,006$ ). En los animales de 12 meses la inyección de OVA-Bp no modificó los niveles de IgM ni los de IgG en comparación con OVA-PBS. El estudio de la relación IgG1/IgG2a específicos para OVA (marcador indirecto de respuesta Th2/Th1) mostró los siguientes resultados: 3m OVA-PBS (3,8) OVA-Bp (4,8) OVA-CFA (2,1) y 12m OVA-PBS (6,5) OVA-Bp (8,17) OVA-CFA (4,0). En conclusión: en ambas edades los niveles de anticuerpos para OVA fueron mayores cuando se inyectó OVA-CFA. Ambos adyuvantes modifican el comportamiento de la respuesta inmune específica tanto en animales de 3m como de 12m permitiéndonos tomarlos como controles de posteriores experimentos donde se proyecta el uso de otros tipos de adyuvantes. CFA es capaz de dar una respuesta de tipo Th1 tanto en animales de 3m como en animales de 12m.

**214. Remisión de la artritis inducida por colágeno mediante el uso de sobrenadantes de cultivos placentarios (SP).** T Gentile, J Dokmetjian, S Miranda, RA Margni

*IDEHU-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.*

La artritis experimental inducida por colágeno (CIA) es un modelo animal de poliartitis crónica; teniendo en cuenta que en esta enfermedad existe un período de remisión durante la preñez con exacerbación después del parto investigamos si la placenta, a través de los factores por ella sintetizados, participa en este proceso. El modelo experimental se desarrolló en ratas Wistar (n=15) inoculando 150  $\mu\text{g}$  de colágeno tipoII (CII) bovino y adyuvante de Freund incompleto (s.c). El 70% de los animales desarrolló CIA entre los días 15 y 21 posteriores a la inoculación de CII con un índice promedio de severidad artrítico (índice de Waites) de  $5,3 \pm 0,8$  El nivel sérico de Acs anti CII fue mayor en los animales con CIA ( $1,42 \pm 0,32$  EU/ml) que en aquellos que no desarrollaron la enfermedad ( $0,850 \pm 0,15$  EU/ml). El título, determinado por ELISA, se expresó en unidades ELISA (EU/ml) usando un suero anti CII de referencia. Los animales con signos clínicos de artritis fueron inoculados con cuatro dosis de SP provenientes de cruza singéneicas (WxW) y como consecuencia de ello se observó en un 65% de los casos una disminución del índice de Waites ( $3,2 \pm 0,45$ ) y de Acs anti CII ( $0,505$  EU/ml). Dos semanas después de haber inyectado la última dosis de SP hubo un aumento de la sintomatología y de los niveles séricos anti-CII. Estos resultados sugieren que la placenta participa activamente en el proceso de remisión observado durante la preñez en este modelo experimental de artritis.

**215. Expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad en células tumorales y su relación con la respuesta inmune.** Mónica Remedi, A Donadio, M Gilardoni, C Sampedro, M Vides, M Depiante

*Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.*

En nuestro laboratorio desarrollamos una línea de células de tumor de rata de crecimiento in vivo e in vitro. Se evaluó la importancia de la sobreexpresión de antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I y II en el desarrollo de tumores in vivo y su relación con la respuesta inmune celular. La expresión de moléculas del CMH clase I y II fue analizada por citometría de flujo en células en estado nativo o post-incubación con medio condicionado, observándose principalmente un aumento en la

expresión de los antígenos clase I en estas últimas. Se evaluó la velocidad de crecimiento tumoral en ratas, a partir de la inoculación por vía subcutánea de células en estado nativo (grupo 1, n=9) o post-incubación (grupo 2, n=9). En animales del grupo 1 se observó un crecimiento tumoral mayor que en animales del grupo 2 ( $p < 0.01$ ). La respuesta proliferativa de células de bazo a células de tumor (específica) y a Concanavalina A (inespecífica) fue expresada como índice de estimulación, reagrupándose a los animales según el comportamiento tumoral. Animales portadores de tumor de comportamiento regresivo mostraron respuesta específica positiva en 4 de 6 casos, mientras que 1 de 3 animales portadores de tumor de crecimiento progresivo mostró igual comportamiento. La respuesta inespecífica en éstos últimos (n=5) fue menor que en animales con tumor de comportamiento regresivo (n=6) y que en animales normales (n=6) ( $9.8 \pm 1.8$ ,  $38.5 \pm 6.7$ ,  $40.4 \pm 2.4$  respectivamente  $p < 0.01$ ). El aumento en la expresión de moléculas del CMH clase I por células tumorales sería importante para el reconocimiento antigénico y el aumento de la respuesta inmune antitumoral.

**216. Mecanismo de Activación de Apoptosis en Células Tumorales.** Eloisi Caldas Lopes, C Waldner, C Mongini, A Escalada, MJ Gravisaco, M Sánchez Lockhart, E Alvarez, S Hajos

*Cátedra de Inmunología, IDEHU-UBA-CONICET.*

Previamente demostramos que la Ciclosporina-A (CsA) inhibió la proliferación de células tumorales LBC por inducción de apoptosis y que la proteína anti-apoptótica Bcl-2 presentaba menor expresión en las células leucémicas tratadas con CsA con respecto de las células no tratadas. En este trabajo estudiamos en las células LBC la expresión de otras proteínas de la familia Bcl-2, luego del tratamiento con CsA (1 µg/ml). Por western blot se encontró una disminución de la expresión de Bcl-2, Bax y Bcl-xl en las células tratadas con respecto a los controles. Por citometría de flujo se analizaron las proteínas intracitoplasmáticas, no se observaron variaciones significativas en el total de Bcl-2 ni Bax con respecto a los controles aunque fue evidente la aparición de una subpoblación de menor intensidad (Bcl-2: 44,86%, Bax: 50,94%, células no tratadas: 5,60%) a expensas de la disminución de la población original que se redujo para Bcl-2 de 97,42 a 52,56%, Bax 95,85 a 44,91%, células no tratadas 96,74 a 91,14%). El FK506 no produjo alteraciones en la proliferación celular ni indujo apoptosis en las células estudiadas. Podemos concluir que si bien se observó una disminución de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xl por efecto de la CsA, también disminuyó la proteína proapoptótica Bax, sugiriendo que otras vías de señalización podrían estar involucradas en la inducción de muerte celular en esta leucemia.

**217. Variaciones de parámetros sanguíneos y urinarios durante el desarrollo de un linfoma en ratas.** Flavia Rondelli<sup>1</sup>, J Radicci<sup>1</sup>, MC Hourquescos<sup>2</sup>, S Radcliffe<sup>2</sup>, J Valenti<sup>1</sup>, J Morini<sup>1</sup>, ML Bay<sup>1</sup>

*Instituto de Inmunología, Facultad Ciencias de Médicas<sup>1</sup>; Laboratorio Hospital Provincial Centenario; Facultad de Ciencias Bioquímicas<sup>2</sup>, UNR, Rosario*

El Lbe56 es un linfoma espontáneo de ratas "e" (100% de toma y muerte para  $5 \times 10^5$  cél. s.c.). A fin de contribuir a su caracterización en virtud de futuras investigaciones se realizaron: estudios anatomopatológicos (AP), hemograma (HE), determinaciones de anticuerpos séricos (inmunodifusión radial) y en orina (inmuno-electroforesis) y depuración de creatinina (DC). Simultáneamente se procesaron ratas normales (N). Se presentan correlaciones (Spearman) entre superficie tumoral (mm<sup>2</sup>) y distintos parámetros. HE: deterioro de todos los parámetros, ej. Glóbulos rojos ( $10^6$ /ml),  $r=0.89$ ,  $n=20$ ,  $p < 0.0001$ ; N( $media \pm ee$ ) ( $7.08 \pm 0.14$ ),  $n=13$ ; Plaquetas ( $10^3$ /µl),  $r=-0.80$ ,  $p < 0.001$ ; N ( $1155,08 \pm 39.07$ ), con aumento en Leucocitos:  $r=0.59$ ,  $n=32$ ,  $p=0.001$ ; N( $10,34 \pm 0.67$ ),  $n=13$ ; DC:  $r=-0.53$ ,  $n=24$ ,  $p=0.011$ . En tumores  $> 1500$  mm<sup>2</sup>, IgG (mg/dl): ( $803.00 \pm 95.44$ ),  $n=10$  vs N( $1714.29 \pm 201.94$ ),  $n=14$ ,  $p < 0.001$ ; IgA e Ig M no difieren

de N; en orina se identificaron cadenas  $\gamma$  y  $\lambda$ . AP: depósitos de cilindros proteicos en riñón y metástasis en ganglios. Asociados al desarrollo tumoral se observa deterioro de los parámetros hematológicos y renales. La excreción de cadenas  $\gamma$  y  $\lambda$  evidencia progresión tumoral que podría ser útil como factor pronóstico y además, confirma el diagnóstico de linfoma de células B, lo que eventualmente permitiría instaurar un tratamiento adecuado.

**218. Nuevo rol para PECAM-1(CD31) en la interacción de células tumorales con endotelio y leucocitos.** MJ Alvarez<sup>1,2</sup>, V Lutzky<sup>1</sup>, J Mordoh<sup>2</sup>, OL Podhajcer<sup>2</sup>, L Fainboim<sup>1</sup>, HE Chuluyan<sup>1</sup>

*<sup>1</sup> Hospital de Clínicas José de San Martín, <sup>2</sup> Fundación Campomar, Buenos Aires*

CD31 (PECAM-1), glicoproteína de membrana con 6 dominios Ig extracelulares, media parcialmente la adhesión homotípica entre células endoteliales y la migración trans-endotelial de leucocitos. En estudios previos demostramos que leucocitos polimorfonucleares (PMN) se adhieren a las células de melanoma a través de moléculas de adhesión, entre ellas CD31. El objetivo de este trabajo fue examinar en profundidad el rol de CD31 en las interacciones de melanoma con PMN y endotelio. Utilizando un panel de 5 mAbs determinamos la expresión de CD31 por citometría de flujo. A pesar de que todos los anticuerpos reaccionaron con células endoteliales de cordón umbilical (HUVE) y leucocitos, un anticuerpo dirigido contra el dominio Ig 6 no reaccionó con melanoma, indicando que CD31 presente en melanoma difiere de CD31 expresada por HUVE y leucocitos. La adhesión *in vitro* de PMN a melanoma fue inhibida parcialmente por mAbs dirigidos contra los dominios Ig 1, 3, 4 y 5, mientras que mAbs dirigidos contra los dominios Ig 2 y 6 no inhibieron la adhesión. Cuando examinamos *in vitro* la adhesión de melanoma a HUVE observamos que sólo los anticuerpos dirigidos contra los dominios 3, 4 y 5 de CD31 lograron inhibir parcialmente la adhesión. Estos resultados muestran que los dominios Ig 1, 3, 4 y 5 de CD31 están involucrados en la adhesión de PMN a melanoma. Además, los dominios 3, 4 y 5 poseen un rol en la adhesión de melanoma a endotelio. Las células tumorales pueden interactuar con HUVE y leucocitos a través de distintos dominios extracelulares de CD31, sugiriendo que CD31 podría tener un rol en la progresión tumoral y en el fenotipo metastásico.

**219. Inducción de cáncer de próstata en ratas con prostatitis autoinmune (PAI) y su relación con el sistema inmune.** Mónica Gilardoni, M Remedi, A Donadio, M Oviedo, G Rabinovich, M Depiante.

*Departamento Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.*

En nuestro laboratorio desarrollamos un modelo experimental de cáncer de próstata, inducido por un tratamiento hormonal con testosterona (T) en combinación con un agente carcinogénico (DMBA), en ratas con PAI generada por el tratamiento con homogenato de gándulas sexuales accesorias masculinas (GAM). El objetivo del presente trabajo fue estudiar los niveles de apoptosis de Li T de bazo y correlacionarlo con los niveles de proliferación linfocitaria y de liberación de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneales en los distintos grupos de experimentación (I- normales; II- T; III- T+DMBA; IV- PAI; V- PAI+DMBA y VI- PAI+T+DMBA). Se demostró por fragmentación del ADN genómico que a medida que la lesión incrementaba su malignidad, aumentaban los niveles de apoptosis de los Li T. La respuesta proliferativa (rp) de esplenocitos a GAM fue analizada expresándose los resultados como índice de estimulación (ie-rp) y considerándose positivos valores mayores a 2. Se observó respuesta negativa en todos los animales de los grupos I (n=5), II (n=7), III (n=7) y V (n=5), mientras que sólo 1 de 6 y 2 de 19 de los grupos IV y VI respectivamente, mostraron respuesta positiva. Por otro lado, en vista de la evidencia que el óxido nítrico (NO) participa como mediador en el daño tisular en enfermedades autoinmunes, se evaluó la liberación de NO en sobrenadantes de

macrófagos en estado basal o estimulados con LPS. Los valores en estado basal fueron significativamente superiores en los grupos V ( $76.5 \pm 17.5$ ;  $n=3$ ) y VI ( $53.4 \pm 11.7$ ;  $n=8$ ) respecto al grupo I (control) ( $23.2 \pm 4.3$ ;  $n=5$ ;  $p \leq 0.05$ ), mientras que los ie con LPS mostraron diferencia estadística entre los grupos II ( $15.7 \pm 2.7$ ;  $n=4$ ) y IV ( $19.7 \pm 4.1$ ;  $n=6$ ) con respecto al grupo control ( $3.0 \pm 0.3$ ;  $p \leq 0.01$ ). Los ie de los grupos V ( $2.5 \pm 1.0$ ) y VI ( $3.1 \pm 0.5$ ) fueron similares al grupo control. Estudios histopatológicos de la glándula revelaron la presencia de lesiones premalignas de diferentes grados (grupos II, III, IV, V, VI) y el desarrollo de carcinomas en el 50% de los animales del grupo VI. La liberación aumentada de NO en estado basal contribuiría a la injuria tisular temprana en los animales con PAI. La falta de respuesta específica en los grupos tratados podría deberse al mecanismo de inmunosupresión a distancia mediada por apoptosis del Li T.

**220. Maduración de la afinidad en anticuerpos monoclonales específicos para un antígeno proteico.** F. A. Goldbaum\*, A. Cauerhoff\*\*, C. A. Velikovskiy\*\*, AS. Llera\*\*\*, M. Riottot\*\*\*\*, RJ Poljak\*\*\*

Fundación Campomar; \*\*IDEHU, Cátedra de Inmunología, FFyB, UBA; \*\*\*CARB, Universidad de Maryland, USA; \*\*\*\*Institut Pasteur, France.

En la respuesta humoral anti-haptenos, la afinidad de los anticuerpos (Acs) aumenta progresivamente, debido a la acumulación de mutaciones somáticas. A este fenómeno se lo denomina maduración de la afinidad. Estudios recientes sugieren que, para antígenos proteicos, el fenómeno es diferente. Nosotros analizamos, mediante técnicas de resonancia plasmónica (BIAcore), las afinidades y las constantes de asociación cinéticas de fragmentos Fab' provenientes de 23 Acs monoclonales (Mab) anti lisozima (HEL) de isotipo IgG<sub>1</sub> obtenidos de inmunizaciones a corto y a largo plazo. Las afinidades se encuentran en un rango de  $1.1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  a  $1.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ , sin diferencias significativas entre ambas poblaciones. Se analizó, por ultracentrifugación analítica, la afinidad de fragmentos Fab' obtenidos a partir de Mabs anti-HEL de isotipo IgM, que mostraron afinidades del orden de  $10^5 \text{ M}^{-1}$ . Esto sugiere que la maduración de la afinidad contra antígenos proteicos es un proceso rápido vinculado al cambio temprano de isotipo de IgM a IgG, sin grandes cambios ulteriores. Sin embargo, el análisis de las secuencias de dos de los Mabs de isotipo IgG<sub>1</sub>, que reconocen el mismo epítipo de HEL, y provienen de los mismos genes de línea germinal, sugiere que en este caso, el aumento del número de mutaciones guarda correlación con el aumento de la afinidad contra el antígeno ( $1.1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  y  $1.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ , respectivamente).

**221. Detección y caracterización de la reactividad cruzada entre componentes de leche de vaca y de soja.** PA Rozenfeld, GH Docena, R Fernández, MC Añón, CA Fossati

Cátedra de Inmunología y CIDCA. Facultad de Ciencias Exactas, La Plata

El único tratamiento para pacientes alérgicos a leche bovina (LB) consiste en la eliminación de la dieta de dicho alimento. El sustituto empleado más frecuentemente es la leche de soja (LS), el cual resulta de escasa efectividad. Por inmunoblotting, con un antisuero de conejo anti-LB, anticuerpos monoclonales contra LB y sueros de pacientes alérgicos a LB se detectó reactividad cruzada entre componentes de LB y de soja, fundamentalmente en la región de 32 kDa. Esta reactividad se cuantificó por ELISA competitivo. Dado que las proteínas de soja no inhiben el 100 % de la unión de anticuerpos a proteínas de leche, y que las proteínas de leche desplazan completamente a los anticuerpos anti-proteínas de soja, podemos concluir que el antisuero contiene anticuerpos de cruce con afinidades similares por proteínas de ambos sistemas. Mediante EAST se detectó la presencia de IgE específica para proteínas de soja en sueros de pacientes alérgicos a LB (clase 2 o mayor). Los resultados indican que los epítopes compartidos entre ambos sistemas estarían localizados en fracciones de caseína (alergeno principal de LB) y diferentes componentes de soja.

**222. Expresión de la molécula de adhesión CD44 en un modelo experimental murino de inflamación.** P. Cabrera, M. Sánchez Lockhart, P. Argibay y S. Hajos

Cátedra de Inmunología, FFyB, UBA; UME. Hospital Italiano, Buenos Aires

Teniendo en cuenta que el CD44 juega un papel importante en inflamación, se trabajó con un modelo murino de isquemia y reperusión (I-R) intestinal que lleva a una respuesta inflamatoria sistémica; es representativo de situaciones clínicas tales como shock hemorrágico, cirugía vascular, isquemia mesentérica y trasplante de intestino delgado. El objetivo de este trabajo fue analizar la expresión y posible función de CD44 y sus variantes en distintos órganos: timo, hígado, ganglio, bazo y pulmón. Los animales se dividieron en tres grupos: a) basal, b) cirugía, c) isquemia y reperusión intestinal y se analizaron en forma individual (6 ratones/grupo). Se procedió a la extracción de ARN, RT del ARNm de CD44, PCR de dicho gen, electroforesis y revelado con Bromuro de Etidio. En los animales isquemiados se observaron diferencias cualitativas notorias en la expresión de isoformas de CD44 con respecto a los controles, evidenciadas por diferencias en No. de pares de bases, especialmente en hígado y bazo (4 de 6 animales), los otros órganos no mostraron diferencias significativas. La expresión diferencial de isoformas de CD44 en hígado estaría relacionada con la infiltración leucocitaria hepática descripta para este modelo.

**223. Mecanismos subyacentes al incremento en las respuestas citotóxicas oxígeno-dependientes mediadas por neutrófilos inducido por dadores de óxido nítrico (NO).** Graciela Andonegui, Analía Trevani, Romina Gamberale, María Cecilia Carreras, JJ Poderoso, Mirta Giordano y JR Geffner

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Laboratorio del Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas, José de San Martín, UBA.

Previamente mostramos que los dadores de NO, S-nitrosoglutatión (NSG) y S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) potencian las respuestas citotóxicas de neutrófilos. Aquí, examinamos los mecanismos involucrados. El tratamiento de neutrófilos con NSG ( $100 \mu\text{M}$ ) por 18 h medió, en relación a las respuestas inducidas por FMLP ( $10^{-7} \text{ M}$ ): a) un incremento en la producción de  $\text{O}_2^-$  ( $6.2 \pm 0.8$  vs  $11 \pm 0.6$  nmoles  $\text{O}_2^-/\text{min}/10^6$  células, controles vs tratadas,  $p < 0.01$ ,  $n=6$ ) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $1.5 \pm 0.3$  vs  $2.6 \pm 0.4$  nmoles  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}/10^6$  células, controles vs tratadas,  $p < 0.01$ ,  $n=5$ ); b) un incremento en la liberación de mieloperoxidasa (MPO) (% del contenido total de MPO liberada:  $0.7 \pm 0.4$  vs  $7.5 \pm 2.3$ , controles vs tratadas,  $p < 0.01$ ,  $n=8$ ) y c) un "switch" en el mecanismo citolítico desde un patrón MPO-independiente a otro MPO-dependiente, a juzgar por el efecto inhibitorio mediado por azida y cianuro ( $10 \text{ mM}$ ) sobre la citotoxicidad mediada por células tratadas (% inhibición  $> 85\%$ ,  $n=7$ ) pero no por células controles (% inhibición  $< 8\%$ ,  $n=7$ ).

**224. Posible papel de la acidificación intracelular en la activación del neutrófilo inducida por la acidosis extracelular.** Analía Trevani, Graciela Andonegui, Romina Gamberale, Mirta Giordano, D. López, F. Minucci, J. Geffner.

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

Previamente demostramos que la acidificación extracelular es capaz de inducir la activación de los neutrófilos humanos. Aquí estudiamos el efecto de la acidificación extracelular sobre el pH intracelular. Observamos que la acidificación extracelular de neutrófilos suspendidos en medio RPMI 1640 (pH 6,7) indujo una abrupta, inmediata y persistente caída del pH intracelular (pHi) de  $7,17 \pm 0,02$  a  $6,70 \pm 0,05$ ;  $X \pm \text{ES}$ ,  $n=7$ . Una caída del pHi similar fue observada en neutrófilos suspendidos en PBS suplementado con bicarbonato (pHi  $7,18 \pm 0,03$  a  $6,7 \pm 0,06$ ;  $n=5$ ), pero no en PBS libre de bicarbonato (pHi  $7,28 \pm 0,02$  a  $7,17 \pm 0,06$ ;  $n=7$ ).

Sólo los neutrófilos en los que se observó una caída en el pH, sufrieron cambios de forma y fluctuaciones de calcio intracelular al ser evaluados por citometría de flujo ( $p < 0,05$ , pH extracelular 7,4 vs 6,7,  $n=6$ ). Estos resultados sugieren que la acidificación intracelular juega un papel importante en la activación del neutrófilo inducida por la acidificación extracelular.

**225. Determinación de valores de referencia de inmunoglobulinas y complemento serico en niños sanos segun grupos etarios.** B Fiammengo, A Ginaca, R Samara, S Krasovec, MI Gaillard, L Bezrodnik

*Servicio de Inmunología, Hospital de Niños, R. Gutiérrez, Buenos Aires*

Se estudiaron sueros de 217 niños sanos eutróficos entre 1 mes y 16 años de edad. IgG, IgA, IgM, C3 y C4 se cuantificó por nefelometría y la IgD por IDR. Los datos se analizaron en EPIINFO 6. **Resultados:** Los pacientes fueron divididos en 9 grupos etarios, encontrándose los siguientes valores de Igs. (expresados en mg/dl):

EDAD	n	Niveles IgG *	Niveles IgA*	Niveles IgM*	NNivee
1-3ms	9	555±132	22±15	59±41	64±40
4-6ms	6	597±200	55±24	76±23	84±23
7-12ms	12	935±346	47±29	120±44	120±44
1- 2a	24	1094±358	86±48	119±36	115±34
2- 3a	17	1089±259	86±46	105±26	104±26
3- 5a	27	1100±236	101±49	120±57	112±41
6- 8a	39	1136±236	152±74	128±45	128±46
9-11a	31	1227±258	163±76	125±57	137±64
12-16a	53	1264±280	182±70	151±69	134±46

$n=217$ . \*Media  $\pm$  1 D.S

Los niveles de complemento no fueron influenciados por la edad: C3 = 90 - 150 mg/100 ml, C4 = 17-30 mg/100ml, ( $X \pm 1DS$ )  $n=193$ . Se observa un paulatino aumento en los niveles de IgD sérica con la edad, hallándose hasta los 2-3 años un alto porcentaje de individuos con valores no demostrables. Los valores hallados enfatizan la importancia de utilizar rangos relacionados con la edad en pacientes pediátricos.

**226. Vacunas anti HVB-1 conteniendo RN-205 como inmunomodulador- Cinética de la respuesta inmune humoral y celular en bovinos.** S Romera, PN Ferrari\*, M Puntel, P Zamorano, V Alcón, J Pacheco, M Borca, A Sadir\*

\*C.I.C.V-INTA-Castelar- C (77). \*\*Neomar S.A.

La rinotraqueitis infecciosa bovina es una enfermedad con alto impacto económico en Argentina por las patologías respiratorias y reproductivas que produce. En este proyecto se evaluó la efectividad de vacunas contra Herpes Virus Bovino-1 (HVB-1), incluyendo RN-205 (obtenido en escala industrial a partir de bacterias Gram Negativas) como inmunomodulador. Se inmunizaron 6 grupos de bovinos. Los grupos (1) ( $n=13$ ) y (2) ( $n=10$ ) recibieron dosis de 5 ml de HVB-1 inactivo con y sin RN-205 respectivamente. El grupo (3) (control,  $n=3$ ) recibió solo RN-205. Los grupos (4) ( $n=5$ ) y (5) ( $n=5$ ) recibieron 3 ml de virus inactivo con y sin RN-205 respectivamente. Al grupo (6) ( $n=7$ ) se le inocularon en forma separada 3 ml de la formulación viral y 5 ml de una formulación más concentrada de RN-205. Se revacunó a los 30 días posvacunación. Los anticuerpos (Ac) fueron cuantificados por ELISA durante 60 días. La respuesta inmune celular (RIC) fue evaluada por el test de linfo-proliferación (TLP). A los 37 días (pico de Ac) se pudo observar que: la inclusión de RN-205 en la formulación ya sea junto con el HVB-1 inactivo (1) o en forma separada (6) condujo a un mayor aumento de niveles de Ac, comparado con sus respectivos controles sin RN-205 (3.5 vs 2.92 y 3.54 vs 2.91 respectivamente). Por otro lado, los grupos (1) y (6) fueron los más eficientes en inducir RIC y se mantuvieron esta res-

puesta celular en todo el período de estudio. Se puede concluir que la incorporación de RN-205 a la formulación resulta en una vacuna más efectiva aumentando tanto la respuesta humoral ( $p < 0,02$ ) como celular ( $p < 0,05$ ).

**227. Evaluación de la respuesta inmune inducida en animales inmunizados por vía oral. Utilización de plantas transgénicas como inmunógeno.** A Peralta, MJ Dus Santos, K Trono, C Carrillo, A Wigdorovitz, MV Borca

*CICV, INTA Castelar.*

La posibilidad de usar plantas modificadas genéticamente para la producción de vacunas orales obliga al desarrollo de modelos experimentales para el estudio de la respuesta inmune inducida por inmunización oral. Primeramente, se desarrolló un protocolo de inmunización oral utilizando OVA como antígeno control. Los resultados positivos obtenidos nos permitió continuar el estudio utilizando como antígeno el Virus de la Fiebre Aftosa inactivado y purificado (VFA). Los ratones inmunizados oralmente desarrollaron una repuesta humoral específica anti-VFA y resultaron protegidos frente al desafío viral. Posteriormente, se utilizaron plantas de alfalfa que expresan la proteína estructural VP1 del VFA, desarrolladas en nuestro laboratorio para inmunizar animales por vía oral e intraperitoneal. Los anticuerpos obtenidos de los animales inmunizados por ambas vías, mostraron una intensa reacción en ELISA frente a la partícula viral resultando protegidos frente al desafío viral. Estos resultados sugieren la posibilidad de la administración de inmunógenos por vía oral, aún en aquellos casos en que el desarrollo de un estado de inmunidad sistémica es necesario para la prevención de la infección.

**228. Características de la respuesta en ratón al componente tetánico de vacunas.** M Fernández Miyakawa, N Mateo, S Deluchi, ML Brero

*Centro Nacional De Control de Calidad de Biológicos Dr C G Malbrán, Buenos Aires*

El presente estudio de la respuesta humoral inducida por el componente tetánico de vacunas en ratón tiene por objeto establecer número mínimo de animales, dilución de vacuna y duración del ensayo, a fin de diseñar un método de evaluación de vacunas por ELISA que pueda reemplazar al método de desafío OMS. Se comparó la respuesta Ig total por ELISA (UI/ml) y seroneutralización (SNT) al día 28 en 20 vacunas ( $r=0,96$   $p=0,0001$ ), se midió la afinidad media por desplazamiento en ELISA en cada mezcla de 10 sueros y la distribución de subclases de IgG. IgTotal e IgG se igualan a partir del día 21. Los valores de Ig al día 21 ( $2,96 \pm 0,5$ ) y al 28 ( $3,02 \pm 0,52$ ) no muestran diferencias. La relación entre la dosis de vacuna y la media aritmética de los títulos ( $n=16$ ) por ELISA ( $y=15,3 \times e^{-1,4x}$   $r=0,98$ ). Existe una clara tendencia a la baja afinidad en títulos bajos inducidos por vacunas diluidas. Las subclases mostraron el mismo patrón de distribución en vacunas TT, DT y DPT; siendo IgG<sub>1</sub> la subclase dominante (>57%) e IgG<sub>2b</sub> la del suero hiperinmune de referencia de ELISA (60%). La formulación de la vacuna no influye en el tipo de respuesta de anticuerpos analizada y los intervalos de confianza del promedio de los títulos ( $n=10$ ) para cada vacuna está comprendido entre 50-200%. Se propone que la evaluación de la respuesta debería realizarse a partir del día 21; la dilución de elección de la vacuna debería ser aquella que induzca títulos bajos (<1 UI/ml) y el nro. mínimo de ratones debe ser 10, con lo cual se reduce en 7 veces el nro. de animales.

**229. Estudio de la respuesta humoral contra las proteínas ribosomales P de Trypanosoma cruzi.** Pablo López Bergami, F Quintana, M Levín.

*Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET), Buenos Aires.*

Las proteínas ribosomales P de *T. cruzi* son antígenos relevantes en la cardiopatía chagásica crónica. Se demostró la parti-

cipación de los anticuerpos anti-P en la generación de alteraciones electrocardiográficas en modelos experimentales. En el presente trabajo se estudió la respuesta humoral producida al inmunizar ratones Balb/c con las proteínas recombinantes TcP2 $\beta$ , TcP0 y MoP (proteína P de ratón) ya que éstas difieren en la secuencia del epítipo C-terminal (R13, P015 y H13 respectivamente). Se estudió la cinética de inducción de anticuerpos y se observaron a partir de la segunda inmunización significativos niveles de anticuerpos ( $p < 0,01$ ) contra el inmunógeno utilizado. Estos anticuerpos fueron de tipo IgG1, IgG2a e IgG2b. Mediante Elisa y Western blot se determinó la inexistencia de reacción cruzada entre las distintas proteínas P. En los ratones inmunizados con TcP2 $\beta$  se observó la inducción de anticuerpos contra R13 ( $p < 0,01$ ) y contra H13 ( $p < 0,01$ ). Al igual que en los sueros de pacientes chagásicos la reactividad contra R13 fue mayor a la de H13. No se obtuvo reacción contra P015. En los ratones inmunizados con TcP0 se observó la presencia de anticuerpos contra P015 ( $p < 0,01$ ). Este perfil de anticuerpos coincide con el observado en pacientes chagásicos.

**230. Incidencia de anticuerpos específicos para alimentos en distintas patologías alérgicas.** Mercedes Ferrero, D Córdoba, S Ontivero, MD Romero

*Laboratorio de Inmunopatología, Investigación y Docencia (LIIDO) y Hospital Tránsito Cáceres de Allende, Córdoba, Argentina*

El objetivo de este trabajo fue determinar si era significativa la incidencia de anticuerpos específicos para alimentos en pacientes alérgicos. Se determinaron anticuerpos IgE, IgG e IgA específicos para alimentos en 125 pacientes con asma, rinitis, urticaria y eczema por ELISA y se compararon con una población normal de 60 individuos. La frecuencia de anticuerpos IgE específicos para carne de vaca, tomate, cítricos, leche de vaca, gliadina y huevo fue de 58,5%, 30,2%, 22,4%, 16,9%, 10,9% y 8,1% respectivamente ( $P < 0,01$  para carne, tomate, cítricos, leche y huevo). Se observó una distribución selectiva de los anticuerpos según la patología estudiada. En asma la frecuencia de anticuerpos para carne y cítricos y tomate fue 85,0% ( $P < 0,001$ ), 30,0% y 20,0%; ( $P < 0,01$ ) respectivamente. En urticaria y eczema: 46,0%, 42,3% y 26,9% respectivamente;  $P < 0,01$  para todos los antígenos. En rinitis: 20,0%, 20,0% y 40,0%;  $P$ : NS,  $P < 0,05$  y  $P < 0,01$  respectivamente. Anticuerpos IgG e IgA para gliadina se observaron en 48,3% y 28,3% respectivamente en la población alérgica resultando significativa la diferencia con respecto a la población normal ( $P < 0,001$ ). Conclusiones: Anticuerpos IgE específicos para carne de vaca, cítricos y tomate se presentan respectivamente con mayor frecuencia en asma, urticaria-eczema y rinitis resultando no significativos para gliadina. Los anticuerpos IgG e IgA para gliadina definirían una población con síntomas mixtos: síndrome de mala absorción y alergia.

**231. ANCA y anti-Fibronectina (a-Fn).** Alicia Toffi, José Moreno, Ester Saball

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

En un trabajo anterior realizado con sólo 13 muestras de pacientes con vasculitis observamos un porcentaje de positividad de a-Fn del 69,2% y una correlación positiva con los títulos de ANCA. El objetivo del presente trabajo fue ampliar el estudio realizando la determinación de ambos autoanticuerpos en 237 muestras provenientes de pacientes con enfermedades autoinmunes categorizadas en: vasculitis primarias (VP=26), vasculitis secundarias (VS=31) y no vasculitis (NV=180). La determinación de ANCA se realizó por inmunofluorescencia indirecta y la de a-Fn por ELISA. Para el análisis estadístico se aplicaron el test de Kruskal-Wallis y el de correlación de Spearman ( $r_s$ ). Los resultados: a) muestran que el porcentaje de positividad de a-Fn en vasculitis es del 54%, que el título promedio de ANCA en VP (152) y VS (148) es significativamente mayor que en NV (109), ( $p = 0,00002$ ) y que no

existen diferencias significativas en los títulos de a-Fn ( $p = 0,14$ ) y b) confirman la correlación significativa entre ambas variables en las muestras de pacientes con vasculitis ( $r_s = 0,414$ ,  $p = 0,0019$ ). Este estudio reafirma la importancia de ANCA en vasculitis y sugiere el interés pronóstico que tendría su determinación en paralelo con a-Fn.

**232. Estudio de los anticuerpos antifosfolípido (APL) en sueros de pacientes anticardiolipina positivos (aCL+) de la provincia de San Luis. II. Especificidades de IgG más relevantes en sueros aCL(+).** D Ramírez, MS Di Genaro, SM Verbeke, B Micalizzi

*Cátedra de Inmunología y Centro de Inmunología Clínica. Universidad Nacional de San Luis. 5700-San Luis. Argentina*

El síndrome antifosfolípido es una patología autoinmune caracterizada por la presencia en el suero de anticuerpos anticardiolipina (aCL) y otros APL. La literatura pone de relieve la importancia de la especificidad de los anticuerpos anti-PLs en la exhibición semiológica del síndrome y sus perspectivas terapéuticas. Se determinaron las especificidades de IgG en 6 sueros de 5 pacientes aCL(+) y 20, aCL(-), de la región (dilución 1:50), usando un ensayo de ELISA (ver parte I). Se usó: PC (fosfatidilcolina), PE (fosfatidiletanolamina), PS (fosfatidilserina), PI (fosfatidilinositol) y PG (fosfatidilglicerol); el conjugado, anticadena  $\gamma$  - peroxidasa en una dilución 1:1000 y posterior lectura a 492nm. Para PC no se observaron diferencias significativas en la reactividad de los sueros de pacientes y controles. Mientras que si las hubo, para PE ( $p < 0,001$ ); PS, PI y PG ( $p < 0,05$ ). Estos hallazgos demuestran que en el grupo de pacientes estudiado, la especificidad de IgG más relevante está dirigida hacia PE, las otras especificidades probablemente tengan su significado clínico y terapéutico.

**233. Incremento de los metabolitos de la ciclooxigenasa (COX) en la infección con *Trypanosoma cruzi*.** RL Cardoni, MI Antúnez, C Morales

*Instituto Nacional de Parasitología, Dr M. Fátala Chabén, Buenos Aires*

Se estudiaron los niveles séricos de TXB<sub>2</sub>, PGF2a y 6-keto PGF1a en 2 cepas de ratones con diferente curso de la infección por *T. cruzi*, cepa Tulahén. Los BALB/c presentan una etapa aguda con alta parasitemia y mortalidad, mientras que sólo los C3H desarrollan una patología crónica progresiva. Los niveles de los 3 metabolitos, dosados por ELISA, incrementaron durante la 3ª sem pi, con similares cinéticas y concentraciones en ambas cepas (en BALB/c infectado, I: TXB<sub>2</sub>=197±26, PGF2a=11±4, 6-keto-PGF1a=1.9±0.2, en ng/ml, a los 17 días pi. Diferencias con el normal  $p < 0,05$ , test de *t*, en todos los casos). En la etapa crónica de la infección sólo se halló aumentado el TXB<sub>2</sub> en los ratones C3H (I: 88±9, Normal: 55±11,  $p < 0,05$ ), que presentan activación de células fagocíticas y daño tisular. En la etapa aguda los niveles de activación de la COX, similares en ambas cepas, acompañan a la parasitemia y a la activación de células fagocíticas.

**234. Efecto de la edad sobre la eritrofagocitosis en un modelo murino.** Claudia Biondi, C Cotorrueo, Alejandra Ensínck, J. Monti\*, Liliana Racca, M Cristina Carrillo\*, Amelia Racca

*Inmunología, Facultad Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR, \*IFISE-CONICET, Rosario*

La acumulación de IgG autóloga sobre los glóbulos rojos senescentes (GRSe) es un mecanismo propuesto para la destrucción eritrocitaria vía fagocitosis. Esta remoción selectiva podría modificarse en los individuos ancianos. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la edad sobre la fagocitosis de GR envejecidos *in vitro* o *in vivo* en un modelo murino. Se trabajó con ratas Wistar machos de 4 meses ( $n = 9$ ) y 18 meses ( $n = 9$ ). Las ratas se sacrificaron 24 hs después de ser inyectadas i.p. con GR.

Los macrófagos peritoneales obtenidos se enfrentaron con: GRSe y GR jóvenes (J) separados por centrifugación diferencial; GR envejecidos (GRE) *in vitro* con y sin plasma. Se realizó el ensayo de eritrofagocitosis y se determinaron Células Fagocíticas Activas (CFA). Los % de CFA en ratas viejas fueron: GRSe: (17.8±1.7) GRJ (≤4), GRE con plasma (17.5±1.5), GRE sin plasma (≤4) y en ratas jóvenes (11.2±1.3, ≤4, 9.4±1.9, ≤4 respectivamente). El aumento en la fagocitosis de GRSe y GRE con plasma (p<0.001) confirma la participación de la IgG autóloga. Los % CFA fueron significativamente mayores en las ratas viejas (p<0.001) indicando que este proceso incrementaría con la edad.

**235. Cambios en la funcionalidad del macrófago alveolar según la edad.** A Goldman, C Rubel, DR Tasat

*Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Departamento de Radiobiología, CNEA y Universidad Nacional de San Martín, Buenos Aires*

El proceso de envejecimiento ha sido vinculado a la producción de especies reactivas del oxígeno y a la disminución de la respuesta inmune, afectando la funcionalidad de los macrófagos alveolares pulmonares (PAMs) y los mecanismos de defensa en el tracto respiratorio. Hemos investigado el efecto del envejecimiento sobre la actividad metabólica de este tipo celular. Estudios previos indican un incremento en la producción de anión superóxido ( $O_2^-$ ) por célula en las poblaciones de PAMs en función de la edad del animal (Medicina 57:42, 1997). En este trabajo analizamos la actividad citotóxica de los PAMs en ratas Wistar jóvenes (J) y adultas (A) mediante el ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Distintas dosis de PAMs (0.125-0.250 y 0.5 x  $10^6$  cells/well) provenientes de lavados bronqueoalveolares se incubaron en presencia de eritrocitos de pollo (marcados  $^{51}Cr$ ) sensibilizados con anticuerpo de conejo anti eritrocito de pollo durante 18 hs. Los datos de ADCC muestran una actividad citotóxica significativamente menor en los PAMs J = 15.6 ± 0.6 respecto de A = 25 ± 3.5 (n = 5),  $\chi^2 \pm E.S.$ , p < 0.05). Los resultados sugieren un aumento en la capacidad citotóxica de los PAMs además del ya observado incremento en el grado de estrés oxidativo durante envejecimiento de esta especie animal.

**236. Análisis de imágenes a nivel celular del efecto del Enalapril en macrófagos alveolares (AM).** DR Tasat, R Lopez, N Basso, B M de Rey.

*ININCA y CNEA-UNSAM, Buenos Aires*

En el tratamiento de la hipertensión arterial se bloquea la formación de la angiotensina II inhibiendo la enzima de conversión de la angiotensina (ACE). Sin embargo, la administración de inhibidores de ACE produce hiperactividad bronquial. A fin de establecer una relación entre estas drogas y la funcionalidad de células pulmonares evaluamos la producción de anión superóxido ( $O_2^-$ ) en AM de ratas Wistar (n=8) bajo tratamiento crónico con Enalapril, inhibidor de ACE. El Enalapril (E) fue suministrado en el agua de bebida (10mg/kg/día) durante 6 meses desde el destete. El grupo control (C) bebió agua común durante el mismo lapso. La producción de  $O_2^-$  se midió por célula mediante la reducción del NBT utilizando un analizador de imágenes IBAS, Kontron. Los resultados expresados como densidad óptica, muestran una diferencia significativa entre los dos grupos experimentales (C: 23.3 ± 4.9 vs E: 47 ± 6.2,  $X \pm E.S.$ , p<0.01). La modificación del estrés oxidativo de los AM inducida por el Enalapril podría estar relacionada con hiperactividad bronquial.

**237. Rol de los AGPI n-3 Sobre el timo de rata en crecimiento.** Inés Fernández, A Pallaro, NH Slobodianik

*Laboratorio de Nutrición Experimental, Cátedra de Nutrición Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.*

Desequilibrios nutricionales afectan la proliferación y la maduración celular tímica. Ratas de la Cepa Wistar al destete, reciben durante 9 días, dieta a base de proteína de maíz al 6,5% (M),

desequilibrada en su composición de aminoácidos indispensables, suplementada con AGPI n-3, en cantidades diferentes (M50=12 mg/día y M100=24 mg/día, respectivamente). Al finalizar el período experimental los animales fueron sacrificados; se extrajo el timo y se determinó el recuento celular (Rc) y el número absoluto de células T caracterizadas por el Anticuerpo Monoclonal W3/13 (Nc). El análisis estadístico (Test de Anova y Cálculo de la MDSS: MDSS=4,96, p<0,05), demostró que Rc y Nc sólo difieren al comparar M100 (n=7) con respecto a M (n=11) (23,2±9,1 vs 12,8±7,2; 16,7±6,8 vs 11,4±3,8, respectivamente), no encontrándose diferencias entre M y M50 (n=6). La suplementación de dietas de maíz con AGPI n-3, permitirían restablecer la proliferación y la población celular T W3/13+, siendo dicho efecto dependiente de la cantidad agregada. Financiado parcialmente por la UBA-TB 077.

**238. Calidad proteica y timo: actividad de adenosina deaminasa (ADA) y purina nucleósido fosforilasa (PNP)#.** Felio MS, Slobodianik NH

*Cátedra de Nutrición. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA*

Se estudió la actividad de ADA y PNP-enzimas relacionadas con el funcionamiento de los linfocitos T en timo de ratas alimentadas desde el destete con dieta aportadora de proteína de baja calidad y en baja concentración, analizándose el efecto de la posterior realimentación. Ratas Wistar al destete recibieron dieta al 6.5% de proteína de maíz (M) durante 18 días. Un grupo fue sacrificado y otro se realimentó con dieta al 20% de caseína durante 20 días (R). Los lotes controles de igual edad recibieron desde el destete dieta stock de vivero (C, CR). Al finalizar la experiencia se extrajo y pesó el timo (Pt), determinándose la actividad de ADA y PNP ( $\mu\text{mol de ácido úrico} \times 10^{-1}/\text{Pt}(\text{mg})/\text{Peso corporal}^{0.75}$  (g)). Los resultados fueron: ADA: M: 25.0 ± 6.4\*; C: 9.8 ± 1.5; R: 13.4 ± 2.9; CR: 14.5 ± 4.0; PNP: M: 7.2 ± 1.2\*; C: 4.3 ± 1.5; R: 3.5 ± 0.8; CR: 5.3 ± 1.7 (\*p<0.01 con respecto a C). La administración de dieta de baja calidad proteica aumenta la actividad de ADA y PNP. Dicho efecto se revierte al administrar dieta aportadora de proteína de alta calidad y en alta concentración durante 20 días. Parcialmente financiado por UBA (TB 077).

**ENDOCRINOLOGIA: DIABETES, LIPIDOS Y ADENOHIPOFISIS**

**239. Perturbación hormonal de la adaptación hueso/musculo.** E Roldán, A Pérez Lloret, R Capozza, G Cointry, R Capigioni, H Schiessl, JL Ferretti

*Gador, Buenos Aires; CEMFoC, UnR, Rosario; IDIM/FIM, Buenos Aires; Stratec, Pforzheim, Alemania*

La masa ósea crece linealmente con la muscular con pendiente única para toda edad, talla, peso y sexo. Tras la pubertad las curvas grafican más alto, y más en mujeres premenopáusicas (PreMP) que en hombres. Estudiando 6 hombres, 20 mujeres preMP y 29 postMP normales (pQCT de diáfisis tibial y musculatura sural), demostramos que la *calidad mecánica* ósea está determinada por la *fuerza muscular regional* ( $R^2=0.81$ , p<0.001), con independencia de sexo y hábito corporal; y describimos una perturbación endocrina de ese equilibrio mecanostático: Indicadores de masa (área cortical), diseño arquitectónico (momento de inercia) y calidad mecánica ósea (*Stress-Strain Index*) correlacionaron con el área de sección muscular en hombres y mujeres preMP (p<0.001) con pendientes únicas; pero en mujeres postMP lo hicieron con menor significado y pendiente (ANCOVA, p<0.001). Esto muestra que el ambiente endocrino puede desplazar el *setpoint* mecanostático óseo, y fundamenta una concepción biomecánica inédita de la osteoporosis.

**240. Afinidad entre la albúmina sérica (A) y calcio (Ca) en pacientes con lepra lepromatosa (LL)..** MC Vidal, H Abranzon, O Bottasso, M Vidal, RC Puche

Laboratorio de Biología Osea, Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas y Cátedra de Biología, Facultad de Ciencias Bioquímicas, UNR, Rosario

Por su afinidad y capacidad, la A sérica es la principal proteína involucrada en el transporte de Ca. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio han demostrado que los pacientes LL presentan hipocalcemia con calcemia iónica, proteínas totales y equilibrio ácido-base normales. El objetivo de este trabajo fue estudiar la asociación Ca-A, estimar la masa molecular (MM) y el punto isoeléctrico (Pi) de la A de pacientes LL y sujetos sanos. Se empleó A aislada por cromatografía de afinidad. La fijación de Ca a la A se investigó determinando el Ca fijado por mol de A (r) midiendo Ca libre con electrodo ión específico. La MM se estimó por SDS/PAGE en condiciones reductoras y el Pi por isoelectrofoque. Los valores de r (M/Mol) son  $1.7 \pm 0.2$  y  $1.0 \pm 0.2$ , para controles y LL respectivamente ( $p < 0.02$ ). La MM es de 67 KDa y el Pi de 5.0 para ambas A. Estos resultados confirman que la afinidad de la A por el Ca en los pacientes LL es significativamente menor que en sujetos sanos y que ello no es atribuible a diferencias en la MM ni Pi. La diferencia en afinidad puede atribuirse a ligamiento a la A de productos metabólicos de la enfermedad.

**241. Genotipos de apolipoproteína E (apo E) en sujetos diabéticos con riesgo para enfermedad coronaria (EC).** Adriana M Almará, Beatriz R Bouvet, EA Ceccarelli

Departamento de Bioquímica Clínica. PROMUBIE-CONICET, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR - CIUNR, Rosario

Existen controversias acerca de la relación entre el alelo E4 de apoE y el riesgo para EC. En este trabajo se investigó el polimorfismo genético de apoE (ASA-PCR) en individuos diabéticos (edad:  $51.4 \pm 7.6$  años,  $n=24$ ) con riesgo para EC: colesterol total (CT; mg/dl)  $> 200$ ; CT/C-HDL  $> 4.5$ . Como grupo control se incluyeron individuos diabéticos (edad:  $50.6 \pm 10.9$  años;  $n=14$ ) con parámetros lipídicos normales: CT:  $174.2 \pm 21.5$ ; CT/C-HDL:  $3.8 \pm 0.7$ ; triglicéridos (TG; mg/dl):  $110.1 \pm 61.2$ . Los valores de lípidos en el grupo de riesgo fueron: CT:  $279.16 \pm 42.8^*$ ; CT/C-HDL:  $6.8 \pm 1.3^*$ ; TG:  $241.62 \pm 159.33^*$  ( $p < 0.001$  vs. control). No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos (riesgo/control) en las frecuencias de los alelos E4:  $0.146/0.107$  y E3:  $0.812/0.714$  pero sí en las del alelo E2:  $0.042/0.179$  ( $p < 0.05$ ). CT, CT/C-HDL y TG entre genotipos fueron similares en ambos grupos. Se concluye que no habría asociación entre alelo E4 y riesgo para EC en sujetos diabéticos. Debido a la baja frecuencia del alelo E2 debería analizarse un número mayor de individuos para poder demostrar su mayor prevalencia en el grupo control.

**242. Contenido de ácidos glucurónico y siálico en matriz ósea no colágena de ratas diabéticas.** Digna Caferra, María del C Fernández, G Manonelles, RC Puche, Martha E Locatto

Laboratorio de Biología Osea, Facultad de Medicina, UNR, Rosario.

La matriz ósea no colágena contiene macromoléculas ricas en ácidos glucurónico y siálico: El objetivo del presente trabajo es obtener información acerca de estos componentes del fémur de la rata diabética. Se procesaron extractos de polvo de hueso de ratas diabéticas (D) y sus controles (C). Se realizaron dos extracciones: una con EDTA pH 7,5 y la siguiente sobre el residuo anterior luego de incubarlo con colagenasa. Los extractos se cromatografiaron sobre DEAE celulosa. Las fracciones, analizadas para ácido glucurónico y siálico, mostraron aumento de estos componentes en el digesto proveniente de las ratas diabéticas. Ácido Glucurónico EDTA: C vs. D:  $1507 \pm 76$  ug/g de hueso vs.  $1432 \pm 52$  DIGESTO:  $944 \pm 66$  vs.  $2411 \pm 297^*$ . Ácido Siálico EDTA, C vs D  $392 \pm 101$  vs.  $402 \pm 165$  DIGESTO:  $348 \pm 65$  vs.  $677 \pm 166^*$ . El tiempo de la diabetes aumentó la concentración de los ácidos Glucurónico y Siálico del digesto (ug/g de hueso). A los 40 días post-aloxano: 1553, 309, (Glicemia  $390 \pm 29$  mg/dl). A

los 70 días: 2840, 861 (Glicemia  $541 \pm 10$ ). Se concluye que en la rata diabética por aloxano la matriz no colágena del hueso contiene mayor proporción de ácidos glucurónico y siálico que los controles. Los valores dependen de los valores de glicemia y del tiempo de exposición a la misma.

**243. Efectos de la insulina y/o glicemia sobre el flujo plasmático renal en ratas intactas y diabéticas por aloxano.** Verónica Di Loreto, Hilda Moreno, RC Puche, Martha E Locatto

Laboratorio de Biología Osea, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Rosario

El objetivo del presente trabajo es analizar el efecto de la insulina y/o glicemia sobre el FPR de ratas intactas (C) y diabéticas por aloxano (D). Las ratas diabéticas presentan entre los 10 a 20 días post aloxano un amplio rango de valores de  $[Cl_{in}]$  y  $[Cl_{PAH}]$ :  $[Cl_{in}]$ : C:  $0.80$  a  $1.04$  ml/min; D:  $0.22$  a  $1.63$ .  $[Cl_{PAH}]$ : C:  $1.92$  a  $5.52$  ml/min; D:  $0.45$  a  $9.22$ . La perfusión con glucosa  $0.28$  M, (que estimula la secreción de insulina endógena), reduce estos valores aproximadamente a la mitad del valor basal. Los valores de insulinemia y glucemia basales y postperfusión se correlacionaron significativamente con el  $[Cl_{PAH}]$  en C:  $[Cl_{PAH}]$  vs Insulinemia,  $r = 0.78^{***}$ ; vs. glicemia,  $r = 0.84^{***}$ . En diabéticas con páncreas residual, (capaz de segregar insulina):  $[Cl_{PAH}]$  vs. Insulina,  $r = 0.64^*$  y vs. glicemia,  $r = 0.75^*$ . Los  $[Cl_{in}]$  y  $[Cl_{PAH}]$  se correlacionaron positivamente (C,  $r = 0.71^{***}$ ; D:  $r = 0.72^{**}$ ) pero con diferencia significativa entre pendientes (C:  $0.19 \pm 0.02$ ; D:  $0.13 \pm 0.01^*$ ). Estos resultados hacen presumir que en el estado diabético además de las modificaciones en el FPR, la insulina y/o la glicemia modifican otros factores no identificados que condicionan la GFR.

**244. Complicaciones diabéticas (CD) y excreción urinaria de glucosaminogluanos (eGAG).** O Rebolledo, N Cédola, Sara Actis Dato, Claudia Refi, C González.

GENEXA, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, La Plata; y Departamento de Farmacología, UBA, Buenos Aires

En la diabetes aparecen alteraciones en los proteogluanos y sus cadenas de GAG en distintos componentes tisulares. En este estudio se evaluó la relación entre la eGAG (mét. carbazol), el grado de control metabólico (HbA1), el aclaram. de creatinina (AC), la creatinina urinaria (CU), la albuminuria (MA) y la presencia de CD [neuropatía (N), nefropatía (Ne), micro-macrovasculopatía (MVP)] en 35 diabéticos (D) T1, y 27 D T2 respecto de 32 sujetos no diabéticos (C). La eGAG fue mayor en la población diabética  $15.7 \pm 1.4$  mg/24h vs  $10.2 \pm 0.9$  (C),  $p < 0.005$ , en particular en los D descompensados (HbA1  $> 9\%$ )  $16.3 \pm 1.5$ ,  $p < 0.001$ . En los DT1, pero no en los DT 2, el aumento de eGAG precedió a la MA que  $20$   $\mu$ g/min (Ne incipiente). En los DT2 la eGAG fue mayor en aquellos con hipertensión arterial (HTA). La eGAG (mg/24h) se asoció (correlación con rangos rS de Spearman) con HbA1  $p < 0.01$ , HTA  $p < 0.04$  y N  $p < 0.036$  y con baja intensidad con MVP; la eGAG (mmol/mol creat. orina) se asoció con HbA1  $p < 0.04$ , negativamente con CU  $p < 0.02$  y AC  $p < 0.05$ . El incremento en la eGAG podría resultar un indicador del grado de descompensación metabólica y un marcador precoz de la posibilidad de desarrollar CD.

**245. Catabolismo de VLDL en ratas genéticamente diabéticas.** S Daniele, L Morisoli, L Schreier, G Berg, S Martínez, S Montenegro, M Tarrés

Cátedra de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Cátedra de Biología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR; Laboratorio Lípidos y Lipoproteínas, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA

En estudios previos demostramos que ratas con diabetes espontánea (eSS) presentaban hipertrigliceridemia caracterizada por VLDL sobrecargada de triglicéridos (Tg). Con el fin de profundizar en el camino catabólico de VLDL, se estudiaron ratas eSS macho de 12 meses de edad,  $n=8$  y controles Wistar (W),  $n=7$ .

En sangre obtenida después de 10 h de ayuno, se midió Co-HDL y se aisló VLDL e IDL por ultracentrifugación secuencial. Se midió Colesterol (Co) y Tg en las fracciones lipoproteicas y se determinó la actividad de lipasa hepática (LH) en plasma post-heparínico (PPH). La relación Co/Tg en IDL de eSS (media±SD; 0,072±0,043) fue semejante a la de su precursora VLDL (0,08±0,019), indicando que no ocurrió la transformación lipolítica esperada, mientras que en W, Co/Tg en IDL fue mayor que en su VLDL precursora (0,19±0,006 vs 0,11±0,021)  $p < 0,001$ . No se observó diferencias entre LH de eSS y W (19,5±0,07  $\mu\text{mol ac.grasos/mlPPH}$  y 20,6±1,4 respectivamente). El Co-HDL menor en eSS (15,2±2,3 mg/dl) que en W (23,1±2,3)  $p < 0,001$ , podría deberse a la disminución de la lipólisis de VLDL y a la buena actividad de LH.

**246. Dislipemia en ratas eSS genéticamente diabéticas.** S Daniele, L Morisoli, L Schreier, S Sanguinetti, S Montenegro, S Martínez, M Tarrés

*Cátedra de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Cátedra de Biología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR; Laboratorio Lípidos y Lipoproteínas, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA*

Se caracterizó la dislipemia presente en las ratas macho eSS de 12 meses de edad (n=8) y Wistar (W) (n=7) como controles. Después de un ayuno de 10 h se determinó: insulina (I  $\mu\text{mol/ml}$ ), ácidos grasos libres (NEFA mmol/l), colesterol (Co mg/dl), Co-HDL (mg/dl) y Triglicéridos (Tg mg/dl). Se aisló VLDL cuantificándose sus componentes: Co, Tg, fosfolípidos y proteínas (Pro), se estimó su tamaño a través de la relación Tg/Pro. Se encontró aumento de I ( $p < 0,05$ ) y de los niveles de NEFA ( $p < 0,001$ ) en las eSS ( $X \pm SD$ ; 38±4,6 y 1,35±0,07 respectivamente) vs W (20,0±3,6 y 0,92±0,03). El Co (eSS=105±9,0 vs W=57±2,2) y los Tg (eSS=227±24,5 vs W=97,3±5,5) fueron mayores en eSS ( $p < 0,001$ ). Co-HDL en eSS (15,2±0,95) fue menor al de W (23,1±0,88)  $p < 0,001$ . La composición porcentual de VLDL mostró mayor proporción de Tg en las eSS (67,4±6,5%) que en las W (45,9±2,8%). Tg/Pro indicó que las VLDL de las eSS fueron más grandes que las de W (7,68±3,63 vs. 1,79±0,35)  $p < 0,001$ . La hiperinsulinemia, el aumento de NEFA, la hipertrigliceridemia con disminución de Co-HDL y la formación de partículas de VLDL sobrecargadas de Tg de producción hepática, son compatibles con síndrome de insulinoresistencia.

**247. Estudio rítmico luz-oscuridad de la presión arterial y la excreción urinaria de catecolaminas en dos líneas de ratas endocríadas:  $\beta$  con diabetes precedida de obesidad y  $\alpha$  eumetabólica.** Sara Weinschelbaum-Jairala, Susana Calderari, Marta Barontini, Inés Amado, J Elena Ochoa, Esther Proto, María del C Gayol, Marta Posadas

*Facultad de Bioquímica y Ciencias Médicas, IFISE, UNR, Hospital de Niños R. Guitérrez, Buenos Aires*

Se estudiaron ratas macho adultas de las líneas  $\alpha$  eumetabólica y  $\beta$  con diabetes precedida de obesidad. La presión arterial, medida indirectamente con un manguito colocado en la cola fue: mmHg ( $x \pm SD$ ): 7h  $\beta$  145,3  $\pm$  12,9 vs 7h  $\alpha$  124,7  $\pm$  12,9 ( $p < 0,05$ ) y 19h  $\beta$  136,7  $\pm$  6,1 vs 19h  $\alpha$  107,4  $\pm$  17,2 ( $p < 0,01$ ). La excreción urinaria de catecolaminas (CAT) por HPLC con detección electroquímica se expresó en ng x 12h ( $x \pm ES$ ). Se evaluaron DA, DOPAC, DOPA, EPI, NA, DHPG. Todas las CAT variaron en el mismo sentido. Ej: DHPG:  $\beta$  luz 1462  $\pm$  396 vs osc. 4299  $\pm$  883 ( $p < 0,001$ ).  $\alpha$  luz 20  $\pm$  1,7 vs osc. 194  $\pm$  60 ( $p < 0,05$ ). Total 24h:  $\beta$  5740  $\pm$  386 vs  $\alpha$  214  $\pm$  31 ( $p < 0,001$ ). La lipólisis:[NEFA] plasmáticos en mmol/l, mostró en un trabajo anterior un valor mayor en la línea  $\beta$  respecto de la  $\alpha$  ( $p < 0,01$ ) y un ritmo inalterado, con un pico nocturno y otro mayor en la fase de luz, de reposo y relativa inanición. Si bien el máximo valor de CAT es nocturno y no coincide con la máxima lipólisis, la tasa de producción de CAT, evidentemente aumentada en  $\beta$ , podría favorecer la mayor lipólisis en esta cepa. Por otra parte, la resistencia insulínica de  $\beta$  sería

la causa de su hipertensión y favorecería en esa línea la sensibilidad a hormonas lipolíticas como CAT y cortisol.

**248. Funcionalidad de Islotes Pancreáticos porcinos en cámaras de difusión (CD).** C Jatimiansky, E de la Canal y A Abalovich.

*Hospital Escuela José de San Martín y ININCA. Facultad de Medicina, UBA*

*Introducción:* Para evitar el rechazo del xenotransplante de islotes se protege a los mismos con CD que permiten el pasaje selectivo de nutrientes y desechos y evitan el contacto con células inmunocompetentes. El objetivo de este estudio es optimizar el diseño de las CD para prolongar la viabilidad de los islotes. Se midió la producción de insulina como índice de funcionalidad. *Métodos:* El aislamiento de los islotes se llevó a cabo según la técnica de Ricordi modificada (viabilidad > 90% Tripan Blue). Los islotes obtenidos fueron suspendidos en agarosa 1%. Se inyectaron a razón de 233 (A), 111 (B), 55 (C) y 28 (D) islotes equivalentes por CD (n=5 para cada concentración). Se colocaron en pocillos de multiwell y se cubrieron con 1 ml de RPMI 1640 (glucosa 11mM) a 37°C y CO<sub>2</sub> 5%. Se dosó la insulina producida con un kit comercial de MEIA cada 48 Hs. *Resultados:* ( $X \pm SEM$ ) Se observó un pico máximo de producción de insulina a las 207 hs de cultivo en todos los grupos (4,26±0,31  $\times 10^{-5}$  (A), 4,41±0,29  $\times 10^{-5}$  (B), 6,00  $\pm$  0,56  $\times 10^{-5}$  (C) y 6,08  $\pm$  0,71  $\times 10^{-5}$  (D) mU/islotEq/min. A partir de ese momento se observó una disminución progresiva. En las CD que tenían un mayor número de islotes se produjo un menor rendimiento por islote equivalente aunque la producción total por CD fue mayor. *Conclusiones:* Si bien la geometría de las CD se mejoró con respecto a experiencias anteriores demostró no ser todavía la óptima. Sin embargo no se puede descartar que el medio de cultivo carezca de algún elemento esencial para la vida de los islotes.

**249. Clasificación multivariada de ratas de la línea diabética eSS.** María C Tarrés, Silvana Montenegro, Stella Martínez, Nora Moscoloni, Fernanda Toniolo.

*Cátedra de Biología, Facultad de Ciencias Médicas, CIUNR. PIAD, UNR, Rosario*

Nuestro objetivo fue clasificar las ratas de línea eSS, modelo de diabetes tipo 2, a través de la curva de tolerancia glucídica y otras variables que pudieran influir en la manifestación del síndrome. Se analizó, en 484 machos, peso al nacimiento, tamaño de la camada, peso al destete, edad y peso al efectuar la curva de tolerancia, mes de nacimiento y de realización de la curva, G0, G30, G60 y G120 (glucemia de ayuno y a los 30, 60 y 120 min de la sobrecarga con glucosa) y glucosuria. Se aplicó el método de correspondencias múltiples recodificando las variables metabólicas continuas en categorías. En el gráfico factorial se obtuvo un ordenamiento según niveles crecientes de G0 y de alteración de la tolerancia glucídica. El análisis se completó con la construcción de una tipología. Se formaron 4 clases que, al relacionarlas con la clasificación de la Asociación Americana de Diabetes (1998), produjo esta configuración de individuos: 1) los más jóvenes, de menor peso, con G0 normal, sin glucosuria pero con alteración de la tolerancia glucídica; 2) los que tienen G0 normal y G120 correspondiente a diabetes; 3) los que expresan en G0 una situación alterada para procesar la glucosa y G120 propia de diabetes y 4) los de mayor peso y edad y con G0 y G120 en la categoría de diabetes. Con esta metodología fue posible efectuar una clasificación multivariada de los animales eSS e identificar fases en la progresión del síndrome.

**250. Secreciones de la pars tuberalis de la adenohipofisis estimulan la liberación de lh desde la pars distalis M Lafarque, L Oliveros, M Ezquer, L Aguado**

*Laboratorio de Biología de la Reproducción, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis*

Tenemos evidencias que secreciones de Pars Tuberalis bovina (PT) liberan Prolactina desde células dispersas de la Pars Distalis (PD) de rata. Ahora se aisló y cultivó una población de células de PT, cuyas secreciones liberan LH en 30 min desde PD al ser estimuladas con sobrenadante del cultivo: I) de la totalidad de células de PT en distintas concentraciones, II) de células separadas por gradiente de Percoll entre 30 y 80 %, III) de células del 50 y 60% de Percoll en concentración creciente, IV) a su vez, células de PD fueron estimuladas con III en experimentos de superfusión. Se observó máxima liberación de LH en I con 9  $\mu$ g de proteína ( $p < 0.001$ ); II fracciones 50 y 60% ( $p < 0.001$ ); III con 6 mg de proteína ( $p < 0.001$ ); IV se observó franca estimulación de la liberación de LH ( $p < 0.001$ ). La purificación parcial de las células de PT y de sus secreciones, muestra que determinadas células de la PT serían las productoras del factor(es) que estimula la liberación de LH desde la PD.

**251. Efectos de los antiandrogénos no esteroideos sobre la población gonadotropa adenohipofisaria.** SB Jurado<sup>1</sup>, GM Cónsole<sup>2</sup>, SB Rulli<sup>3</sup>, FL Riccillo<sup>2</sup>, CLA Gómez Dum<sup>2</sup>, RS Calandra<sup>3</sup>

Servicio Central Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP<sup>1</sup>, Cátedra de Histología B. Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, CICBA<sup>2</sup>. IBYME, Buenos Aires

El bloqueo específico del receptor androgénico por los antiandrogénos no esteroideos flutamida y Casodex ha resultado una valiosa herramienta para el estudio *in vivo*. Se estudiaron los efectos de su administración en ratas machos prepúberes a nivel hipofisario. Se utilizaron ratas Sprague-Dawley prepúberes (23 d, trat. 10 d, n=6): a) controles C, b) flutamida (F) (10 mg /día/rata), c) Casodex (Cas) (10 mg/día/rata), d) castradas (Cx) e) castradas sustituidas con DHT (Cx/DHT) (40  $\mu$ g/día/rata). Las hipófisis se procesaron para microscopía de luz y electrónica y se inmunomarcaron (EnVision-Dako-anti-FSH/anti-LH-DAB). Se determinaron la densidad de volumen (DV) y el área celular promedio (A) mediante analizador de imágenes (Optimas). La FSH y LH séricas fueron determinadas por RIA. DV, A y los niveles séricos de gonadotropinas aumentaron significativamente ( $p < 0.05$ ) en Cas, F y Cx, respecto Cx/DHT y C. DV-FSH: C: 0.06 $\pm$ 0.009, Cx: 0.13 $\pm$ 0.014, Cx/DHT: 0.04 $\pm$ 0.009, Cas: 0.15 $\pm$ 0.017, F: 0.14 $\pm$ 0.014; DV-LH: C: 0.09 $\pm$ 0.007, Cx: 0.14 $\pm$ 0.012, Cx/DHT: 0.07 $\pm$ 0.011, Cas: 0.2 $\pm$ 0.023, F: 0.15 $\pm$ 0.017. A nivel ultraestructural se halló incremento del RER y Golgi. Concluimos que los efectos de los antiandrogénos y la castración en ratas prepúberes produjeron una hiperplasia-hipertrofia de la población gonadotropa.

**252. Péptidos  $\beta$ -amiloides y función adenohipofisaria.** Federico Bolognani, L Miravalle, YE Sosa, D Naumovich, RG Goya.

INIBIOLP-Histología B, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.

La presencia de depósitos amiloides ha sido demostrada en la hipófisis de individuos ancianos. En el presente estudio se evaluó la acción de 3 péptidos amiloides, el A $\beta$ 42 humano, el A $\beta$ 40 humano y el A $\beta$ 40 murino, sobre la secreción hormonal de la adenohipofisis (AP) de rata. Se incubaron células AP dispersas durante 1 h en presencia de dosis de los mencionados péptidos en un rango de 1 a 5000 nM, midiéndose la liberación de prolactina (PRL), hormona de crecimiento (GH), gonadotropinas (LH y FSH) y tirotrófina (TSH). Ninguno de los 3 péptidos interfirió significativamente, en el rango de dosis indicado, con los RIAs para estas hormonas. A partir de 100 y 500 nM, A $\beta$ 42 produjo un efecto inhibitorio sobre GH y PRL, respectivamente, careciendo de efecto para las otras hormonas. A $\beta$ 40h y A $\beta$ 40r tuvieron un claro efecto estimulador dosis-dependiente sobre FSH y sobre GH, aunque para GH, las dosis más altas (b500 nM) resultaron inhibitorias. A $\beta$ 40h, pero no A $\beta$ 40r, resultó inhibitorio sobre la liberación de LH. Estos datos sugieren que en el individuo senil los péptidos amiloides circulantes podrían afectar la función adenohipofisaria.

**253. Efectos de un extracto de larvas de mosquito *Culex pipiens* L sobre la liberación de hormona de crecimiento (GH) y tirotrófina (TSH) en células hipofisarias de ratas normales y estrogenizadas.** Federico Bolognani, J. R. Ronderos, R. G. Goya.

INIBIOLP-Cátedra de Histología B. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata.

Se describe el efecto de una fracción de origen larval sobre la liberación de GH y TSH en células hipofisarias de ratas normales o portadoras de tumores hipofisarios (estrogenizadas). Larvas de III estadio del mosquito *Culex pipiens* fueron homogeneizadas y ultracentrifugadas a 100.000 g por 60 min. El sobrenadante fue dializado (PM>12Kd) en solución salina. Hipófisis pertenecientes a ratas normales o tratadas durante 6 semanas con 0.4 mg estradiol/rata-semana (para inducirles tumores hipofisarios) fueron disecadas y sus células dispersadas mediante colagenasa. Se realizaron experimentos de incubación en presencia de la fracción dializada. Los resultados muestran una inhibición de la liberación basal de GH tanto en células normales como hiperplásicas ( $p < 0.001$ ) y una estimulación de la liberación de TSH en células normales ( $p < 0.001$ ), con un patrón tiempo- y dosis-dependiente. La actividad hipofisiotrópica en estas preparaciones larvales sugiere la existencia de moléculas relacionadas con los factores hipotalámicos de mamíferos.

**254. Dimorfismo sexual en la tumorigénesis hipofisaria inducida por dietilestilbestrol (DES) en ratas F344.** G. Piroli, Luciana Pietranera, Claudia Grillo, Mónica Ferrini, Victoria Lux-Lantos y AF De Nicola

IBYME-CONICET y Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA

Las hembras (H) F344 tratadas crónicamente con DES desarrollan prolactinomas de mayor tamaño que los machos (M). Para evaluar este fenómeno, empleamos M, H y H androgenizadas neonatalmente con 100  $\mu$ g de propionato de testosterona (HTP). A los 3 meses, los animales se gonadectomizaron, y se dividieron en controles (C) y tratados con pellets de DES. A los 40 días de tratamiento, los pesos hipofisarios no difirieron entre los C (MC: 9.3 $\pm$  2.5 mg, HC: 10.3 $\pm$ 0.4, HTPC: 8.9 $\pm$ 0.3), pero fueron mayores en HDES (83.8 $\pm$ 5.7) que en MDES (34.4 $\pm$ 1.2;  $p < 0.001$ ) y en HTPDES (31.3 $\pm$ 4.2;  $p < 0.001$ ; NS vs. MDES). La prolactina sérica tampoco difirió en C (MC: 7.12 $\pm$  1.91 ng/ml, HC: 9.96 $\pm$ 3.01, HTPC: 8.36 $\pm$ 4.37), y nuevamente fue mayor en HDES (4100.0 $\pm$ 469.0) que en MDES (731.0 $\pm$ 98.4;  $p < 0.001$ ) y en HTPDES (603.9 $\pm$ 103.9;  $p < 0.001$ ; NS vs. MDES). A nivel hipofisario, los receptores estrogénicos nucleares (RE<sub>2</sub>) en C fueron bajos (~ 30 fmol (<sup>3</sup>H)E<sub>2</sub>/mg ADN), y DES produjo la inducción habitual de RE<sub>2</sub> (>100 fmol). Paradójicamente, los RE<sub>2</sub> fueron menores en HDES (101.3 $\pm$ 9.0) que en MDES (174.6 $\pm$ 16.8;  $p < 0.05$ ) y en HTPDES (150.3 $\pm$ 27.7;  $p < 0.05$ ; NS vs. MDES). Los receptores progestínicos siguieron un perfil similar (HDES: 25.4 $\pm$ 1.2 fmol (<sup>3</sup>H)R5020/mg prot.; MDES: 46.9 $\pm$ 1.4,  $p < 0.001$ ; HTPDES 35.7 $\pm$ 5.8;  $p < 0.05$  vs. HDES y MDES). Conclusión: Las HTP se asemejan más a los M que a las H normales en términos de tumorigénesis hipofisaria, quedando por comprobar si los cambios se producen por alteraciones hipotalámicas.

## GASTROENTEROLOGIA I

**255. Actividad glutatión S-transferasa (GST) en intestino de ratas machos y hembras. Evaluación del contenido de subunidades.** Viviana Catania, M Luquita, E Sánchez Pozzi, Sandra Arriaga, L Veggi, A Mottino

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

El sistema enzimático GST está constituido por isoenzimas homo o heterodiméricas de subunidades denominadas Y<sub>a</sub>, Y<sub>b</sub><sub>1</sub>, Y<sub>b</sub><sub>2</sub> e Y<sub>p</sub>, entre otras. Anteriormente, demostramos que la actividad GST hepática es sexo-dependiente, mostrando los machos mayor contenido de Y<sub>b</sub><sub>1</sub> e Y<sub>b</sub><sub>2</sub>. En este trabajo se evaluó la actividad GST (sustrato: 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno, CDNB) y la composición en subunidades de GST en intestino de los siguientes grupos experimentales: hembras normales (HN), machos normales (MN), machos castrados (MC), y machos castrados inyectados con testosterona (MC+T, 70 mg de enantato de T/kg peso/semana, durante 4 semanas). Las actividades GST (nmoles de CDNB conjugado/min/mg proteína ± DS, n=3-4) fueron: HN: 227±36 y MC: 396±25 significativamente diferentes (p<0.05) de MN: 512±40 y MC+T: 527±28. Además, al estudiar el contenido de las distintas subunidades de GST por Western blot, observamos que tanto HN como MC muestran un menor contenido de Y<sub>b</sub><sub>2</sub> e Y<sub>p</sub> con respecto a MN y a MC+T. La administración de T a MC recupera el contenido de Y<sub>b</sub><sub>2</sub> e Y<sub>p</sub> con respecto a MN. **Conclusiones:** 1- MN muestra mayor actividad GST intestinal que HN y MC. 2- La administración de T a MC recupera la actividad de MN. 3- Por lo tanto, T sería responsable de la diferencia de actividad observada entre sexos, efecto que se ejerce a través de la modulación del contenido de las subunidades Y<sub>b</sub><sub>2</sub> e Y<sub>p</sub> principalmente.

**256. Simvastatin y Citoprotección gástrica. Mecanismo óxido nítrico dependiente.** JA Cesolari, OM Laudanno, P San Miguel, OA Bedini, JM Esnarriaga, G Guastalli, C Maglione, G Piombo

*Cátedras de Histología y Embriología y de Patología Médica III, Facultad de Ciencias Médicas, UNR, Rosario*

El objetivo de este trabajo fue estudiar si el fármaco Simvastatin (SIM), utilizado en dislipidemias, 1) es citoprotector de la mucosa gástrica y 2) su mecanismo de acción. **Método:** a grupos de ratas hembras "e" tipo Wistar (n=7), 200 g, en ayunas de 24 hs, agua ad libitum, se les realizó lo siguiente: Experimento I: grupo A: solución fisiológica, 1ml, IG, B: etanol 96% (ETOH), 1 ml, IG y se esperó 20 min.; C: SIM 1 mg/Kg IG, 120 min y luego ETOH. Experimento II: A: L-NMMA (antagonista de la NOSc) 50 mg/Kg, IP, 15 min, luego SIM y posteriormente ETOH; B: Aminoguanidina (antagonista de la NOSi) 25 mg/Kg, IP, 60 min, luego SIM y posterior ETOH, C: Indometacina (inhibidora de la prostaglandina sintetasa) 10 mg/Kg, SC, 60 min, luego SIM y posterior ETOH. Las ratas fueron sacrificadas por sobredosis de éter. Se les realizó laparotomía y apertura del estómago. Se tabuló el porcentaje de área lesional macroscópica gástrica (%) por planimetría y se obtuvieron cortes para estudios histológicos (HE). **Resultados:** I: % A: 0; B: 35.5±5.5; C: 1.0±0.1 (p<0.001). A la microscopía: A: mucosa normal; B: necrosis superficial y profunda, congestión vascular; C: pérdida del epitelio superficial. II: % A: 80.2±6.1 (p<0.001) B: 90.5±4.6 (p<0.001) C: 15.5±3.2 (p<0.03). Se concluyó que SIM dio citoprotección de la mucosa gástrica y su mecanismo de acción fue dependiente de óxido nítrico y parcialmente de prostaglandinas endógenas.

**257. Esplancnectomía bilateral y función pancreática en la rata** R Resnik, M Cresta, P Scacchi, MJ Brunengo, E González, O Tiscornia

*Estudios Pancreáticos, Hospital de Clínicas y Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA*

Las posibles influencias del SNA, en las interacciones entre páncreas exócrino y endócrino fueron evaluadas en ratas Wistar macho. Se trabajó con 2 grupos, Esplancnectomizadas (ESP) (n=11) (sección bilateral de los nervios espláncnicos) y Controles (Sham)(n=10). Luego de dos meses y en ayunas, se realizó un test de tolerancia a la glucosa administrándose Glucolín 50% (4,5ml/Kg) vía sonda intragástrica. Se determinaron los niveles de glucosa (GI), lipasa (Li), y amilasa (Am) sérica a los 30 y 60 minutos post estímulo. En homogenato de tejido pancreático, se determinó concentración de DNA, RNA y proteínas. Se encontró

una disminución significativa de la GI en ratas ESP, media± ES, mg% 54,94±3,04 vs 72,56±9,01 p<0,05 en condiciones basales y 113,15±6,9 vs 140,1±9,8 p<0,02 a 60 minutos post estímulo. En cuanto a Am y Li no existen diferencias significativas entre grupos, como tampoco las hay para las determinaciones en homogenato de Páncreas. La disminución significativa de la GI en las ratas ESP nos lleva a pensar en una mayor liberación de insulina por supresión de mecanismos inhibitorios de su liberación, regidos por el componente Simpático del SNA con impacto sobre la función endócrina pancreática.

**258. Efecto del aluminio sobre la absorción intestinal de calcio en ratas prepúberes coledocetomizadas.** D Orihuela, Verónica Meichtry, Stella Mahieu

*Cátedra Fisiología Humana, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL, Santa Fe.*

Se ha descrito en niños con atresia biliar extrahepática una malabsorción intestinal de calcio (Ca<sup>2+</sup>) asociada con deficiencia de vitamina D. Por otra parte demostramos que el aluminio (Al), afecta la absorción de Ca<sup>2+</sup> en el duodeno inhibiendo el componente activo del transporte. En este trabajo se analizó el efecto del Al sobre la absorción intestinal de Ca<sup>2+</sup> en un modelo de rata prepúber con coledocetomía (Cx) efectuada por doble ligadura seguida de la resección del ducto biliar común. **Métodos:** a ratas Wistar macho de 35 días se les practicó una Cx (n=16) y 30 días después se agruparon en lotes que recibieron: taurocolato de sodio (TC) (10 mmol por vía endogástrica 18 h y 2 h antes del estudio), calcitriol (D<sub>3</sub>) (0,25 µg/kg, s.c 12 h antes del estudio) o vehículos. Fue incluido un grupo con laparotomía sham (Sh). Se determinó *in vitro* el transporte de Ca<sup>2+</sup> mucoso-seroso (JCa<sub>ms</sub>) en segmentos duodenales evertidos usando <sup>45</sup>Ca como marcador de flujo, en presencia de 0, 2, 5 y 10 µM de Cl<sub>3</sub>Al. **Resultados:** los parámetros de las curvas dosis-respuesta, % reducción del JCa<sub>ms</sub> (E) en función de [Al] (D), fueron: E<sub>max</sub> (%): Cx: 27,1±5,6; Cx+D<sub>3</sub>: 56,2±4,3<sup>a</sup>; Cx+TC: 71,8±8,4<sup>a,b</sup>; Sh: 47,3±5,8<sup>a</sup>. ED<sub>50</sub> (µM): Cx: 2,92±0,52; Cx+D<sub>3</sub>: 4,87±1,72; Cx+TC: 6,32±1,24<sup>a,b</sup>; Sh: 3,95±1,63 (<sup>a</sup>p<0,05 respecto a Cx; <sup>b</sup>p<0,05 respecto a Sh). **Conclusión:** se sabe que la inhibición por Al del transporte de Ca<sup>2+</sup> es dependiente de la vitamina D. La disminución de E<sub>max</sub> y de ED<sub>50</sub> en las ratas con Cx podría deberse a la mala absorción de vitamina D asociada a la mala absorción de lípidos secundaria al déficit de sales biliares duodenales. Esto explicaría la restauración del efecto inhibitorio del Al por administración exógena de D<sub>3</sub> o de la sal biliar TC.

**259. Diagnóstico serológico de la enfermedad celíaca: determinación de anticuerpos antigliadina en base a péptidos de síntesis y antiendomiso en base a transglutaminasa de tejido.** MV Piaggio, AM Demonte, G Sihufe, S Garcilazo, MC Esper, C Veaute, M. Aleanzi

*Cátedra de Bioquímica Básica. INTEBIO. Facultad de Bioquímica y C. B. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe; M. Wagener, Servicio de Gastroenterología, Hospital de Niños Dr. R Gutiérrez de Santa Fe.*

Los ensayos serológicos que se utilizan para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad celíaca son: determinación de anticuerpos antigliadina (AG) y antiendomiso (AE). Recientemente (1997) se identificó a la transglutaminasa de tejido (tTg) como el autoantígeno específico de los AE. Los objetivos de este trabajo fueron determinar la sensibilidad y especificidad de la respuesta serológica frente a tres péptidos de síntesis de la alfa gliadina y a la transglutaminasa de tejido. Las determinaciones de anticuerpos IgG e IgA se efectuaron por enzimmunoensayo en placas sensibilizadas en nuestro laboratorio, utilizando como antígenos gliadina comercial, péptidos de síntesis y tTg de cobayo. El panel de 80 sueros testeados corresponde a pacientes celíacos no tratados y tratados, controles no celíacos y controles sanos; rango de edad: 7 meses a 14 años. El criterio de positividad utilizado fue la evaluación clínica, las pruebas de laboratorio y la biopsia. La sensibilidad obtenida fue del 100 y 95% con una es-

pecificidad del 100 y 85% respectivamente en la respuesta de los anticuerpos anti-tTg, y anti-péptido G-3. Estos resultados corroboran los del descubridor en cuanto a la especificidad de la tTg para la determinación de los anticuerpos AE y presentan a dicho péptido, como un antígeno más específico que la gliadina para la determinación de los anticuerpos AG.

**260. Mecanismos involucrados en la inhibición de la degradación lisosomal de Peroxidasa de Rabanita (HRP) por Taurocolato (TC).** María C Larocca, JM Pellegrino, EA Rodríguez Garay, RA Marinelli

*Instituto de Fisiología Experimental, CONICET-UNR, Rosario*

La sal biliar TC inhibe *in vivo* la degradación lisosomal de proteínas que ingresan al hepatocito por pinocitosis, efecto no mediado por inhibición directa o permanente por TC de las proteasas lisosomales (catepsinas). En este trabajo se estudió si TC produce *in vivo* aumento del pH lisosomal, como posible causante de la inhibición en la actividad de las catepsinas. Asimismo y considerando el conocido efecto de TC como activador de proteína quinasa C (PKC), se analizó el efecto de la activación de PKC sobre la degradación de HRP marcada con  $^{14}\text{C}$ -sacarosa ( $^{14}\text{CS}$ -HRP) en hepatocitos aislados. **Métodos.** Se determinó pH lisosomal en ratas Wistar controles (C) o infundidas con TC (0,8  $\mu\text{mol}/\text{min}100\text{g}$ ), precargando lisosomas con FITC-dextran y, luego de los experimentos, determinando fluorescencia a 530 nm con excitación a 490 (dependiente de pH) y a 450 (independiente de pH) en fracción enriquecida en lisosomas (ML). En hepatocitos aislados se analizó el efecto de TC y de activación de PKC sobre la proteólisis lisosomal, midiendo  $^{14}\text{C}$ -HRP degradada (% de radioactividad soluble en TCA 10%) a distintas concentraciones de TC (0-200  $\mu\text{M}$ ) o del activador de PKC 12-myristato 13-acetato forbólico (PMA) (0-1  $\mu\text{M}$ ). La captación y transporte a lisosomas se estimó como radioactividad total en hepatocitos o en ML. **Resultados.** TC no alteró el pH lisosomal (C 5,93 $\pm$ 0,07, TC 5,91 $\pm$ 0,10). Tanto TC como la activación de PKC por PMA provocó en hepatocitos aislados inhibición en la degradación de  $^{14}\text{CS}$ -HRP en forma dosis dependiente (C 6,5 $\pm$ 0,8, TC100  $\mu\text{M}$  3,6 $\pm$ 1,0#, PMA 1  $\mu\text{M}$  1,7 $\pm$ 1,7#, #p<0,05), sin afectar captación o transporte a lisosomas. **Conclusiones.** La activación de PKC por TC podría mediar la inhibición por esta sal biliar de la degradación lisosomal de proteínas exógenas en hepatocitos. El mecanismo de esta inhibición no involucra aumento del pH lisosomal, como fuera previamente sugerido.

**261. Diferencias asociadas a la edad en el proceso de hepatocarcinogénesis en la rata.** M Cristina Carrillo, Cristina Carnovale, JA Monti, C Favre, Celina Scapini, G Pisani\*, M Cristina Lugano\*.

*IFISE-CONICET, \*Morfología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR, Rosario*

Se analizó la respuesta a la iniciación de la carcinogénesis hepática en ratas machos jóvenes (5 meses) y viejas (18 meses) a través de un diseño experimental multiestadio de iniciación [con un carcinógeno, Aflatoxina B1]-progresión [con un tratamiento combinado de fenobarbital (PB) + hepatectomía parcial (HP)]. **Tratamiento:** HP (ó cirugía SHam)+AFB1 (0.5 mg/kg) +PB (0.1% en agua de bebida, 21 días). Se midió: Glutathion S-transferasa (GST) hepática y sus subunidades constituyentes, focos neoplásicos (% de células iniciadas) e índice de apoptosis. **Resultados:** El tratamiento de iniciación + promoción inhibió la expresión de las GST  $\mu$  (Yb1, Yb2), fundamentalmente Yb2 (que ya en condiciones basales resultó menor en animales viejos), e indujo las GST  $\alpha$  (Ya, Yc). Los focos neoplásicos fueron mayores en animales viejos (2.2% vs. 1% en jóvenes, p<0.05). No se detectó apoptosis en ningún grupo experimental. **Conclusiones:** La deficiencia en Yb2 parece requerirse para la progresión, haciendo más susceptibles a los animales viejos. La ausencia de apoptosis puede deberse a una respuesta aumentada de la proliferación favorecida por el promotor PB.

**262. Función hepatobiliar en la fase aguda de colestasis obstructivas.** Emilio A Rodríguez Garay, Rut M Agüero, G Pisani, Graciela P Rodríguez

*IFISE, CONICET, UNR, Rosario*

En ratas con obstrucción biliar parcial (OP) hemos descrito alteraciones de excreción biliar a las 24 hs y su normalización a 7-12 días. A fin de analizar la evolución de la función hepatobiliar, se utilizaron ratas Wistar machos con OP (n=12), con obstrucción biliar total (OT)(n=11) y con manipuleo del colédoco (S)(n=9). Los estudios en suero fueron realizados a 2, 6 y 12 días del acto quirúrgico, analizándose bilirrubina total (B)( $\mu\text{M}$ ), colesterol total (C)(mg/dl), fosfatasa alcalina (FA)(U/L),  $\gamma$ -GT(U/L) y GPT(U/L). Se efectuó recuento leucocitario en sangre y estudio histológico en hígado. Los resultados a 2, 6 y 12 días fueron OP: B 134 $\pm$ 19, 41 $\pm$ 16\*, 28 $\pm$ 13\*; C 48 $\pm$ 4, 28\* $\pm$ 3, 30 $\pm$ 6\*; FA 360 $\pm$ 19, 227 $\pm$ 40\*, 222 $\pm$ 26\*,  $\gamma$ -GT 24 $\pm$ 2, 21 $\pm$ 3, 18 $\pm$ 2; GPT 68 $\pm$ 15, 38 $\pm$ 6, 42 $\pm$ 14; OT: B 138 $\pm$ 10, 129 $\pm$ 12, 92 $\pm$ 9\*; C: 54 $\pm$ 4, 42 $\pm$ 5, 35 $\pm$ 4\*; FA: 453 $\pm$ 60, 392 $\pm$ 47, 457 $\pm$ 17;  $\gamma$ -GT: 25 $\pm$ 4, 23 $\pm$ 3, 26 $\pm$ 4; GPT: 74 $\pm$ 19, 64 $\pm$ 10, 65 $\pm$ 11; \*p<0.01, #p<0.05. En S 2 días: B 12 $\pm$ 1, C 30 $\pm$ 3, FA 246 $\pm$ 12,  $\gamma$ -GT 38 $\pm$ 4 y GPT 34 $\pm$ 3 sin cambios ulteriores. En OP y OT hubo leucocitosis e infiltrado leucocitario en hígado. Por la evolución de los cambios en el tiempo surgió tendencia a normalización en OP. Los resultados sugieren que las alteraciones a 2 días, podrían involucrar respuesta inflamatoria aguda por daño tisular y liberación de sustancias de acción colestásica (citoquinas?).

**263. Estudio secuencial de enzimas hepáticas en ratas en crecimiento.** M González, MC Contini, N Millen, S Mahieu

*Cátedra de Fisiología Humana, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL, Santa Fe.*

El efecto de la intoxicación con aluminio(Al) sobre el hígado fue evaluado a diferentes edades. Se utilizaron ratas machos, Wistar tratadas (T) (n=8) con hidróxido de aluminio en dosis de 80 mg/kg de peso (i.p), 3 veces por semana, desde el destete y hasta los 60, 90, 120, 150 y 180 días. Se testearon grupos controles (C) inyectados con placebo(solución fisiológica), para todas las edades (n=8). Se dosó  $\gamma$ GT- gamma glutamil transferasa-(método cinético) y GPT-glutámico pirúvico transaminasa-(método colorimétrico) en suero y, GSH- glutathion-(método de Ellman) y GST- glutathion transferasa-(método de Goldstein y Combes) en homogenados hepáticos. Se realizó un test no paramétrico de Mann-Whitney para evaluar si la diferencia fue significativa entre los grupos tratados y sus controles ( $\alpha=0.05$ ). Se obtuvieron diferencias significativas en: GST(nmol/min/g proteína) 60 días(T)= 644 $\pm$  35 vs (C)= 1047  $\pm$  39; 90días (T)= 195  $\pm$  18 vs (C)= 1435  $\pm$  50; 150 días(T)= 147  $\pm$  15 vs (C)= 1310  $\pm$  63; 180 días (T)=112  $\pm$  8 vs (C)=721 $\pm$ 49. Para GSH, GPT y  $\gamma$ GT no se obtuvieron diferencias significativas. El contenido de Al en hígado fue aumentando con el transcurso de la intoxicación obteniéndose para (T) un valor de 187.3  $\mu\text{g}/\text{g}$  tejido húmedo y para (C) un valor de 4.35  $\mu\text{g}/\text{g}$  tejido húmedo a los 180 días. De los resultados surge que el Al, en la forma utilizada, podría disminuir la capacidad de conjugación de la GST (con GSH) del hígado, no reflejándose daño tisular a partir del análisis enzimático y de los estudios histológicos que sólo mostraron infiltración leucocitaria.

## TUMORES

**264. Biopsias por aspiración con aguja fina (BPA) de carcinomas de próstata: Asociación entre morfometría nuclear y marcadores biológicos.** M Maffini, H Ortega, M Muñoz de Toro, EH Luque.

*Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormono-dependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL, Santa Fe*

En BPA de carcinomas de próstata no es posible establecer la clasificación histopatológica en la que se basa el pronóstico del

tumor (clasificación de Gleason). Nuestro objetivo fue evaluar la morfometría nuclear y el valor complementario de marcadores moleculares y celulares (PCNA, Ki67, bcl-2, p53, receptor de andrógenos e índice apoptótico) en BPA de ca de próstata para seleccionar mejor los pacientes con peor pronóstico. Se utilizaron 31 BPA incluidas en parafina. Se usó la morfometría nuclear como indicador pronóstico ya que, trabajos previos en BPA, demostraron que se correlaciona con sobrevida. Se cuantificó el área, perímetro y elipicidad nuclear usando un analizador de imágenes Image Pro-Plus, los biomarcadores se evaluaron por inmunocitoquímica y la apoptosis por TUNEL. El área nuclear se correlacionó positivamente con PCNA (rs: 0.63,  $p < 0,01$ ), Ki67 (rs: 0.33,  $p < 0,05$ ) y bcl-2 (rs: 0.45,  $p < 0,01$ ), mientras que la correlación fue negativa con la apoptosis (rs: -0.39, NS). Los resultados muestran que los tumores más agresivos, seleccionados por morfometría nuclear, tienen alta proliferación y bajo índice apoptótico. La evaluación citopatológica de BPA de carcinomas de próstata, complementada con la evaluación de marcadores de proliferación y muerte celular, permitiría una mejor selección de las estrategias terapéuticas para cada paciente.

**265. Amplificación del gen delta del TCR en linfocitos T mediante PCR en estadios tempranos de linfoma cutáneo a células T (LCCT).** Valeria Mas, Susana Albano, Teresa Alvarellos, C Giraud, Ana Diller, Cristina Ducasse, A Ruiz Lescano.

*Fundación para el progreso de la Medicina y Hospital Privado, Centro Médico de Córdoba.*

LCCT es una patología poco frecuente que plantea dificultades diagnósticas, clínicas e histopatológicas, especialmente en estadios tempranos de la enfermedad. La presencia de mono ó policlonalidad en las células T presentes en la lesión de piel, diferencia LCCT de tejido reactivo. Objetivo: Valorar la utilidad de técnicas moleculares en el diagnóstico temprano y certero de LCCT. Hemos estudiados 5 casos sugestivos de LCCT definidos como "dermatitis inespecífica" (estadio temprano), mediante PCR de diferentes regiones del gen delta ( $\delta$ ) del TCR en linfocitos T. El ADN fue obtenido de biopsias de piel con proteinasa K y extracción con fenol-cloroformo. Las PCR se realizaron con primers dirigidos hacia las regiones V $\delta$ 1-J $\delta$ 1, que detecta los rearreglos V $\delta$ 1-(D $\delta$ )-J $\delta$ 1 (a diversidad en TCR). Los productos fueron visualizados en geles de poli-acrilamida al 10% con bromuro de etidio. Los resultados fueron asociados a la histología, inmunohistoquímica y hallazgos clínicos. En 4 de 5 biopsias de piel, se halló la presencia de banda monoclonal indicando el diagnóstico de LCCT y en la restante el hallazgo de múltiples bandas indicó policlonalidad de las células presentes en la lesión. Hubo concordancia con los hallazgos clínicos e histológicos. Si bien el número de casos es bajo, concluimos que la detección de monoclonalidad de células T utilizando la detección de rearreglos en el gen delta del TCR mediante PCR podría ser de gran utilidad en el diagnóstico de LCCT.

**266. Comparación de la funcionalidad de los ganglios linfáticos regionales de cáncer de mama y otros tumores malignos.** Wanda Di Girolamo, S Coronato, M Salas, O Spinelli, G Laguens

*Cátedra de Patología B, Facultad de Ciencias Médicas UNLP, La Plata*

La actividad funcional de los linfocitos de ganglios linfáticos que drenan tumores malignos humanos reflejan la respuesta inmune del huésped contra el tumor. El cáncer de mama expresa numerosos antígenos, sin embargo, no induce una respuesta inmune eficiente. El objetivo de este trabajo fue comparar la respuesta proliferativa de linfocitos de ganglios linfáticos sin metástasis que drenan carcinomas mamarios (grupo 1, n=12), con los linfocitos de ganglios regionales no metastásicos, de otros tumores malignos (grupo 2, n=11). Ambos grupos eran comparables en edad y clasificación TNM, y no habían recibido tratamiento

previo. Se obtuvo una suspensión de células mononucleares que fue estimulada con Concanavalina A y Pockweed Mitogen, midiéndose la incorporación de timidina tritiada. La respuesta proliferativa de los linfocitos del grupo 1, fue significativamente menor que la del grupo 2, tanto para linfocitos T ( $p < 0,01$ ) como para linfocitos B ( $p < 0,004$ ). Los resultados obtenidos indican que los ganglios linfáticos regionales de carcinoma mamario muestran una disminución de la funcionalidad en comparación con los ganglios linfáticos que drenan otros tipos de tumor, hecho que indicaría una mayor inmunosupresión.

**267. Desarrollo de un modelo experimental de carcinoma murino por inestímulo prolongada.** C Ponzinibbio, RP Laguens

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

A fin de evaluar un sistema de inmunoterapia, se desarrolló el siguiente modelo experimental de carcinoma: Lotes de 6 ratones C3Hs fueron inyectados con una dosis de 400 mg/kg de ciclofosfamida. 48 hs después fueron inoculados con  $10^7$  células de médula ósea de rata Wistar. 60 días más tarde, estos ratones fueron desafiados en el lomo con un parche de piel de rata Wistar de 1 cm<sup>2</sup>. Como controles se emplearon: (a) ratones inyectados sólo con una dosis equivalente de Cf, y (b) lotes de ratones inyectados con Cf y luego inoculados con células de médula ósea de rata. Entre 2 y 4 meses después, el 100% de los ratones del grupo experimental desarrolló un tumor en el celular subcutáneo del dorso, contra 0% en el control (a) y 17% en el control (b). Este tumor histológicamente se vio en todos los casos como un carcinoma anaplásico, con áreas de diferenciación escamosa. Fue transplantable con el mismo tipo histológico en ratones singeneicos y capaz de establecer metástasis pulmonares por inoculación EV. Permitió también el establecimiento de línea tumoral *in vitro*, conservando ésta la capacidad tumorigénica. Conclusión: se describe un modelo experimental de carcinoma, capaz de sostener pasajes seriados, establecer metástasis y pasible de mantener como línea tumoral adherente *in vitro*.

**268. Niveles de organoclorados en tejido adiposo de pacientes con carcinoma de mama.** M Muñoz de Toro<sup>1</sup>, H Beldoménico<sup>2</sup>, S García<sup>2</sup>, EH Luque<sup>1</sup>.

*Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes<sup>1</sup>, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas; Laboratorio Central, Facultad de Ingeniería Química<sup>2</sup>, UNL, Santa Fe*

La salud humana, de animales domésticos y silvestres sufre las consecuencias adversas de la exposición a organoclorados que interactúan con el sistema endócrino por su efecto estrogénico y/o antiandrogénico. Se presentan resultados preliminares de niveles de organoclorados en grasa peritumoral de 9 pacientes (de área urbana, no expuestas ocupacionalmente) con carcinoma de mama. La muestra incluye pre- y post-menopáusicas (edad: 57,9 $\pm$ 10,7) y tumores RE+ y RE-. Se optimizó el dosaje de organoclorados para muestras de  $\leq 500$  mg de tejido adiposo. Se realizó extracción con éter de petróleo, *clean-up* en microcolumna de alúmina y separación en microcolumna de Florisil. La identificación y cuantificación de los compuestos se realizó por cromatografía gas-líquido con captura de electrones. Los resultados de los cromatogramas (mediana y rango) se expresan en  $\mu$ g/kg de grasa. Todas las muestras fueron positivas para: HCB (58; 8-245),  $\beta$ HCH (153; 22-611) y pp'DDE (157; 11-1000) y negativas para DDT y Dieldrin. El límite de detección del ensayo para los diferentes compuestos varió entre 2 y 5  $\mu$ g/kg y el porcentaje de recuperación entre el 75-100%. Muestras tomadas al azar se chequearon por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa, confirmando los resultados obtenidos. Estudios futuros, con mayor número de casos, permitirán establecer la posible asociación entre presencia de organoclorados en la grasa peritumoral y el comportamiento biológico del carcinoma de mama.

**269. El sitio de crecimiento, más que el tipo de tumor, sería el que decide a qué hora se dividen y a qué hora mueren las células tumorales que lo colonizan.** RP Meiss, LL Colombo

*Instituto de Estudios Oncológicos, Academia Nacional de Medicina, Instituto de Oncología, A. H. Roffo, Facultad de Medicina, UBA*

En este trabajo demostramos que 2 tumores murinos muy diferentes, uno de pulmón (PO7) y otro de mama (M3), muestran más mitosis y menos apoptosis al mediodía (D) cuando crecen en el subcutáneo (sc) o en el hígado (hg), y menos mitosis y más apoptosis a medianoche (N) cuando crecen dentro del bazo(bz) o la cavidad peritoneal (cp). Cada ratón generó un dato, que es el promedio de 20 campos de 500X, con H/E. Por razones de espacio, los datos se muestran sólo como X, pues los (n) siempre fueron 5 para PO7 y 10-20 para M3. Todos los SD fueron <10%, y todos los D Vs N fueron  $p < 0.001$ . Mitosis: sc: PO7: D:7.09 N:3.71; M3: D:5.92, N:3.44; cp:PO7: D: 2.98 N:7.16; M3: D:6.93 N:11.67; hg: PO7: D:7.56 N:2.91; M3: D:10.44 N:5.26; bz: PO7: D:3.03 N:4.56; M3: D:6.83 N:10.86; Apoptosis: sc: PO7: D:3.84 N:6.75; M3: D:2.43 N:4.53; cp: PO7: D:7.47 N:4.02, M3: D:13.83 N:5.72; hg: PO7: D:4.21 N:7.93, M3: D:5.86 N:10.51; bz: PO7: D:11.08 N:7.82, M3: D:12.55 N:6.80. Estos datos abren la fuerte sospecha de que podría ser el órgano o sitio de crecimiento el que condiciona el momento de división y muerte de las células tumorales que los colonizan, más que el tipo de tumor. Ello sería importante para la cronofarmacología y la relación huesped-tumor.

**270. Efecto de la cimetidina sobre la hepatocarcinogénesis.**

Elba Vazquez, E Gerez, L Oliveri, F Caballero, A Balle

*CIPYP-CONICET, Química Biológica, FCEN, UBA*

La mayoría de los xenobióticos necesitan ser transformados por el sistema de las monooxigenasas hepáticas para ser excretados. La cimetidina (CIM) es un inhibidor general del P450. El objetivo de este trabajo es investigar si la CIM puede prevenir o revertir la inducción del P450 y otras alteraciones metabólicas originadas por el carcinógeno p-dimetilaminoazobenceno (DAB). Ratonos *CF1* se alimentaron con una dieta basal o con DAB (0.5% p/p). A los 40 días ambos grupos recibieron DAB por otros 35 días más y 10 dosis de CIM (120 mg/kg, ip, 2 veces por semana). La CIM revirtió y previno la inducción provocada sobre la actividad del ALA-S (V[U/mg] N:  $1,4 \cdot 10^4 \pm 0,3 \cdot 10^4$ ; VDAB<sub>40</sub>:  $3,02 \cdot 10^4 \pm 0,6 \cdot 10^4$ ; VDAB<sub>75</sub>:  $1,92 \cdot 10^4 \pm 0,5 \cdot 10^4$ ). El mismo efecto se observó sobre el contenido de P450 (V[nmol/mg] N:  $0,34 \pm 0,03$ ; VDAB<sub>40</sub>:  $1,33 \pm 0,15$ ; VDAB<sub>75</sub>:  $0,78 \pm 0,09$ ). La disminución de la MHO provocada por DAB no varió por tratamiento con CIM. El gran aumento (110%) de GST (VN:  $1,45 \pm 0,25$  U/mg) por efecto del DAB persistió aún con CIM. Esta droga tampoco produjo modificaciones en TBARS y catalasa. Si bien el tratamiento con CIM previno o revirtió parcialmente la inducción del P450 provocada por el DAB y la consecuente alteración sobre el metabolismo del hemo, no cambió el perfil de variación sobre la enzima marcadora de daño hepático y la peroxidación lipídica.

**271. Aumento de la penetración del ALA tópico en la Terapia Fotodinámica de los tumores superficiales.** Adriana Casas, H Fukuda, G Di Venosa, AM del C Balle

*Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP), CONICET-UBA, Buenos Aires*

La Terapia Fotodinámica (TFD) a partir de ácido 5-aminolevúlico (ALA) es un tratamiento antineoplásico particularmente indicado para tumores superficiales. Se basa en la fotosensibilización de las porfirinas sintetizadas a partir de ALA en el tumor. El objetivo del trabajo fue optimizar la eficiencia de penetración del ALA aplicado en forma tópica empleando un tumor mamario de implantación subcutánea en ratones BALB/c, y utilizando para ello distintos vehículos tales como loción, crema, vaselina, DMSO y liposomas. La mayor síntesis de porfirinas tumorales se obtuvo con loción en solución fisiológica (1,75 µg porfirinas/g) y loción

más 10% DMSO (2,09 µg porf./g). Liposomas y crema tuvieron idéntica eficiencia (0,6 µg porf./g) y la vaselina fue menos eficaz (0,3 µg porf./g). Los distintos vehículos no modificaron la profundidad de penetración del ALA en el tumor, en tanto que el DMSO indujo una activación del 10% de la PBG-asa, una de las enzimas involucradas en la síntesis de porfirinas. Los resultados hallados en este modelo revisten importancia para el tratamiento fotodinámico de las metástasis cutáneas de los tumores de mama.

**272. Efecto del Arsenito de Sodio en distintas concentraciones sobre el desarrollo tumoral en un modelo de carcinogénesis experimental en dos etapas** Mónica A Palmieri, B Molinari de Rey

*Dto. Biología-FCEyN-UBA; Dto. Radiobiología-CNEA, Buenos Aires*

Está documentada una mayor incidencia de cáncer en humanos que habitan zonas con aguas arsenicales. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de distintas concentraciones de Arsenito de Na en el agua de bebida, en la generación de tumores epidérmicos en ratones Sencar, que fueron sometidos a un protocolo clásico de carcinogénesis experimental en dos etapas: *iniciación* con DMBA y *promoción* con TPA durante 7 meses. Las soluciones de arsenito fueron preparadas diariamente y suministradas antes y durante la promoción. Las condiciones experimentales fueron: Agua común i)Control, Agua con Arsenito ii)2mg/l, iii)20mg/l y vi)200mg/l. Semanalmente se evaluó: peso de los ratones, nro. de tumores/ratón, porcentaje de ratones con tumor, evolución del tamaño tumoral y consumo de agua/ratón; finalizada la promoción se realizó un diagnóstico patológico de las neoplasias. El consumo de agua en iv) fue notablemente menor que en las otras condiciones. Al cabo de 7 meses de promoción se observó una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en el nro. de tumores/ratón entre los animales tratados y los controles: i)23.14±1.43, ii)16.43±1.69, iii)17±1.41 y iv)15.67±1.67. Los resultados demuestran que en este modelo de carcinogénesis experimental las distintas concentraciones de arsenito de Na en el agua de bebida, disminuyen la incidencia tumoral.

**273. Importancia del oncogen *erbB2* en la proliferación mediada por acetato de medroxiprogesterona (MPA) de tumores mamarios murinos.** ME Balañá, EH Charreau, PV Elizalde

*Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires*

Estudiamos la participación de los receptores ErbBs en la proliferación tumoral mediada por MPA del tumor progestágeno dependiente C4-HD. Resultados previos indicaron ausencia de EGFR, sobreexpresión de p185<sup>erbB2</sup> y p180<sup>erbB3</sup> y expresión moderada de p180<sup>erbB4</sup>. Encontramos que el MPA afecta la actividad intrínseca de p185<sup>erbB2</sup> y p180<sup>erbB3</sup>, aumentando el contenido de fosfotirosina a niveles similares a los encontrados con su ligando, heregulina (HRG). El agregado de oligodesoxi-nucleótidos antisentido (OA) al ARNm de *erbB2* produce una inhibición dosis-dependiente significativa ( $p < 0.001$ ) de la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina respecto de los controles creciendo con o sin MPA 10 nM. El tratamiento con oligo-desoxinucleótidos sentido (OS) no produce efecto sobre la proliferación. (cpm/incubación, C: 412±76; MPA: 1500±57, OA 2 µM: 627 ± 31, OS 2 µM: 1394 ± 114). Cuando las células se trataron con OA a una región altamente conservada del dominio catalítico de la familia de proteínas con actividad de tirosina-quinasa, en las mismas condiciones, se obtuvieron niveles de inhibición similares. (cpm/incubación, MPA: 1500±57, OA 2 µM: 652±29, OS 2 µM: 1544±115). Cuando se utilizó una combinación de 1 µM de cada OA, el nivel de inhibición de la proliferación celular fue similar al encontrado a concentraciones de 2 µM de cualquiera de los OA por separado (1 µM mezcla OA: 558±39, 1 µM mezcla OS: 1402±96). Postulamos que la acción proliferativa del MPA estaría mediada por la activación de p185<sup>erbB2</sup> y p180<sup>erbB3</sup> y que el *erbB2* jugaría un papel preponderante en el crecimiento tumoral.

**274. Modulación de la actividad proteolítica tumoral mediante agentes que alteran la polimerización de la tubulina.** DF Alonso, HG Farina, C Arregui, MA Aon, DE Gomez.

*Laboratorio de Oncología Molecular, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes e Instituto Tecnológico de Chascomús (SECYT/CONICET).*

La proteasas intervienen en la digestión de la matriz extracelular durante la invasión tumoral. El estado del citoesqueleto modularía señales intracelulares que regulan la remodelación de la matriz. Se investigaron los efectos del taxol, que estabiliza las estructuras microtubulares, y nocodazol, que induce la despolimerización de la tubulina, sobre la secreción de uroquinasa ( $\mu$ PA) y metaloproteasas (MMPs) en cultivos de células F3II de carcinoma mamario murino. Monocapas subconfluentes fueron pretratadas durante 24 h en presencia de suero con dosis no citotóxicas de taxol ( $4 \mu\text{M}$ ) o nocodazol ( $1 \mu\text{M}$ ) y se preparó luego un medio condicionado sin suero. Por caseinólisis radial se encontró un aumento en la secreción de  $\mu$ PA en los cultivos expuestos a taxol (Control:  $24.2 \pm 3.6$  vs Taxol:  $56.4 \pm 11.8$  UI/ $10^6$  células;  $p < 0.05$ ) y un descenso en aquellos expuestos a nocodazol (Control:  $20.3 \pm 1.1$  vs Nocodazol:  $6.0 \pm 0.4$  UI/ $10^6$  células;  $p < 0.01$ ). Similares resultados se hallaron en zimografías para la gelatinasa de 105 kDa (MMP-9). Ensayos de inmunofluorescencia y Western blot confirmaron la formación de manojos compactos de tubulina en las células tratadas con taxol y despolimerización del citoesqueleto con nocodazol. Los datos sugieren que, a través de una acción opuesta sobre el citoesqueleto microtubular, taxol y nocodazol modularían de manera inversa la secreción de proteasas en cultivos de carcinoma mamario.

**275. Acción antitumoral de un preparado vacunal del gangliósido GM3 en el melanoma murino B16.** DF Alonso, MR Gabri, DE Gomez.

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

Los gangliósidos son glucolípidos que contienen uno o más residuos de ácido siálico, expresados en melanoma y otras variantes tumorales. Se ensayó un preparado vacunal del monosialogangliósido GM3 (desarrollado y provisto por el Centro de Inmunología Molecular, La Habana, Cuba y el Laboratorio ELEA, Buenos Aires, Argentina) sobre el modelo murino B16. Datos previos del proveedor mostraron la inducción de anticuerpos séricos IgG específicos en animales inmunizados con GM3. Un total de 40 ratones C57BL/6 recibieron 4 dosis de GM3 (120 mg/dosis) conjugado hidrofólicamente a la proteína OMP de *N. meningitidis* y emulsionado en Montanide ISA 51 cada 14 días por vía intramuscular o sólo el adyuvante. El tratamiento fue bien tolerado, no registrándose variaciones significativas en el peso corporal. Siete días después de la última dosis, los animales fueron inoculados con 5.000 ó 50.000 células B16F0 en el espacio subcutáneo del flanco derecho. En los animales inmunizados inoculados con 5.000 células, la toma tumoral fue inhibida (Control: 80% vs. GM3-OMP: 0%;  $p < 0.01$ ) y consecuentemente la sobrevida resultó mayor (Control:  $48 \pm 5$  días vs. GM3-OMP:  $> 60$  días;  $p < 0.001$ ). En los lotes que recibieron 50.000 células, los animales tratados mostraron una mayor latencia y menor diámetro tumoral (Día 38, Control:  $8.7 \pm 2.4$  mm vs. GM3-OMP:  $2.3 \pm 1.4$  mm;  $p < 0.05$ ). Los datos sugieren que la inmunización con un preparado vacunal del gangliósido GM3 reduce el desarrollo del melanoma murino B16.

**276. Vascularización y drenaje linfático en el sitio de un tumor secundario inhibido por resistencia concomitante.** di Gianni PD, Cymberknop D, Meiss R, Franco M, Ruggiero RA, Bustuobad OD.

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

El tumor LB induce estado de tumor dormido en implantes secundarios realizados con diferentes tipos tumorales. Esta inhi-

bición presenta dos mecanismos: directo (sobre las células tumorales) e indirecto (a través de la inhibición de la neovascularización). Hasta hoy, la cuantificación del proceso angiogénico se realizaba mediante el conteo de vasos sanguíneos lo cual requería seccionar el tejido. En este trabajo se utiliza un método no intrusivo de medición de flujo vascular y linfático. Ratones portadores del tumor LB y ratones normales recibieron  $10^6/0.1$  ml células inductoras de vascularización (macrófagos intraperitoneales activados por tioglicolato 3% (PEM)) en el flanco contralateral al tumor primario. Después de 5 días se cuantificaron el flujo sanguíneo y drenaje linfático mediante imágenes del ratón en posición decubito ventral obtenidas en cámara gamma con colimador Pin-Hole. Los glóbulos rojos se marcaron por inoculación de cloruro de estaño intravenoso y tecnecio 99 metaestable ( $99\text{mTc}$ ). Para la linfocentellografía, se inoculó en la almohadilla plantal Linfast (partículas de gelatina  $< 7 \mu\text{m}$ ) marcado radiactivamente con  $99 \text{mTc}$  ( $1 \mu\text{Ci}$ ). El tumor LB inhibió el flujo sanguíneo en la zona contralateral al volumen tumoral (normal:  $1470.8 \pm 315.0$  cpm ( $n=12$ ) vs portador de tumor LB:  $216.1 \pm 23.9$  (9),  $p < 0.05$ ) así como el drenaje linfático de los ganglios inguinales (normal:  $16658 \pm 3489$  (8) vs portador tumor LB:  $8747 \pm 213$  (8),  $p < 0.05$ ). Los resultados confirman la existencia de un mecanismo de inhibición de la neovascularización inducida por un tumor primario LB por métodos no intrusivos.

**277. Proliferación intratubular de células de Sertoli : etapa in situ en la evolución de los tumores de los cordones sexuales y del estroma específico?** Marcela Venara, R Rey, I Bergadá, H Chemes

*CEDIE. Hospital De Niños R. Gutierrez, Buenos Aires*

Los tumores de los cordones sexuales y del estroma testicular comprenden los tumores de células de Sertoli (CS) y Leydig (CL). Comunicamos 6 casos de varones con proliferaciones focales de CS y proponemos que representan una etapa intratubular en el desarrollo de algunos de estos tumores. Eran pre-púberes, edades entre 6 y 11 años; 3 tenían síndrome de Peutz-Jeghers, 4 ginecomastia y 1 precocidad isosexual. Dos tenían tumor calcificante de grandes CS, bilateral con adenomas de CL, 1 tumor de CL, 1 microtumor de tipo grandes CS y 2 sin tumores. En todos el testículo no tumoral tenía focos de proliferación intratubular de CS grandes en reemplazo de las germinales. No se observó pleomorfismo celular, mitosis, ruptura de membrana basal ni invasión del intersticio. Ultraestructuralmente son CS indiferenciadas. Se inmunolocalizó hormona antimülleriana (AMH) (-en tumores y proliferaciones de CS); proteína p53, negativa y antígeno nuclear de proliferación celular (+débil en los tumores). La multicentricidad de las lesiones, su asociación con síndrome de Peutz-Jeghers y tumores de CS y CL, la actividad proliferativa y la falta de reactividad para AMH sugieren lesión displásica con posible potencial tumorígeno.

**278. Inhibición de la angiogénesis mediante el antiestrógeno nafoxidina.** Mariana De Lorenzo, DF Alonso, DE Gomez

*Laboratorio de Oncología Molecular, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes*

La remodelación proteolítica de la matriz extracelular es requerida en la angiogénesis, proceso crítico durante el crecimiento y diseminación de neoplasias sólidas. Considerando el papel del estradiol en la biología vascular, se investigaron las propiedades antiangiogénicas del antiestrógeno no esteroideo nafoxidina sobre cultivos de células endoteliales humanas (HUVEC). La formación de túbulos capilares se ensayó sobre la matriz sintética Matrigel. Se estudió también la producción endotelial de proteasas y sus inhibidores mediante zimogramas, en presencia o ausencia de nafoxidina. En concentraciones no citotóxicas ( $< 5 \mu\text{M}$ ), la nafoxidina inhibió de manera dosis-dependiente la angiogénesis in vitro. Las células endoteliales produjeron en cultivo las serinoproteasas tPA (68 kDa) y  $\mu$ PA (54 kDa) y el inhibidor proteolítico PAI-1 (50 kDa), aunque la exposición al antiestrógeno no modificó los niveles de producción. Por el contrario, la

nafoxidina moduló la actividad gelatinolítica endotelial, induciendo la aparición de formas activas de la metaloproteasa MMP-2 (62 kDa). Además, por Western blot se encontró un aumento en la secreción del inhibidor tisular de metaloproteasas TIMP-1 (dímero de 66 kDa) en presencia de nafoxidina. Los resultados muestran que la nafoxidina inhibe la angiogénesis *in vitro* y el efecto estaría asociado a un incremento de la secreción endotelial de TIMP-1.

## FARMACOLOGIA

- 279. Efecto de la amida del ácido a lipoico sobre la Porfiria Cutánea Tarda experimental.** GL Vilas, Carmen Aldonatti, Leonor C San Martín de Viale, María C Ríos de Molina

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

Se estudió el efecto de la tioctamida (TO) - preparación farmacológica de la amida del ácido a lipoico- sobre la acción porfirinogénica del HCB. Se indujo porfiria en ratas Wistar por administración crónica con HCB, con o sin administración simultánea de TO (grupos I y II), usando como referencia ratas tratadas sólo con el vehículo (Tween 20, grupo III) o con TO (grupo IV). Indicadores de porfiria mostraron que: las curvas de excreción urinaria de ALA, PBG y porfirinas del grupo I quedaron por debajo de las del grupo II. La acumulación de uroporfirina hepática del grupo I fue menor que la del grupo II (1.39 y 1.49 mg/g híg;  $p < 0.05$ ). La actividad urogen decarboxilasa fue 0.043 y 0.025 U/mg prot. para los grupos I y II respectivamente ( $0.05 < p < 0.1$ ). La actividad ALA-sintetasa sólo aumentó en el grupo II respecto del III (10.32 y 7.38 U/mg;  $0.05 < p < 0.1$ ). El contenido de TBARS en el hígado, indicador de peroxidación lipídica, fue menor en el grupo I que en el grupo II (248 y 1030 nmoles/g híg). Así, la TO disminuiría los efectos del HCB debido a su capacidad atrapante de radicales libres y por un efecto directo sobre la urogen decarboxilasa.

- 280. El clonixinato de lisina inhibe la inducción de la Oxido Nítrico Sintasa en el pulmón de rata.** AM Franchi, M Farina, G Di Girolamo, AR de los Santos, ML Martí, MAF Gimeno

*CEFYO, Buenos Aires*

Las drogas antiinflamatorias no esteroideas (AINES) son efectivas en el tratamiento de los procesos inflamatorios, debido en parte a su acción sobre la síntesis de prostaglandinas. Existe evidencia creciente de la participación del óxido nítrico (NO) en las respuestas inflamatorias. **Objetivo:** Estudiar la posible acción de dos AINES sobre la NO sintasa (NOS). **Métodos:** La actividad de la NOS se determinó por la técnica de Snyder modificada. **Resultados:** Ni la indometacina ( $1 \times 10^{-6} M$  *in vitro* ni el clonixinato de lisina ( $CL$ )  $2.28 \times 10^{-5} M$  *in vitro* fueron capaces de modificar la producción de NO de pulmón de rata pretratada con lipopolisacárido (LPS) 5mg/kg *in vivo*. Sin embargo, cuando el CL fue administrado *in vivo* 40 mg/kg i.p. en forma simultánea con el LPS, inhibió el aumento producido por el LPS en la síntesis de NO (Control:  $684 \pm 44$  cpm/mg peso húmedo; LPS:  $1085 \pm 76$ ; LPS +CL:  $737 \pm 90$ ,  $p < 0.05$ ). La I inyectada *in vivo* 10mg/kg i.p. no bloqueó el aumento de NO producido por el LPS (I:  $1002 \pm 89$ ). **Conclusión:** Los resultados sugieren que el CL inhibe la inducción de la NOS en el pulmón de rata.

- 281. Análisis de los parámetros hemorreológicos y hepáticos durante el tratamiento con *Ligaria cuneifolia* (Lc).** G Mengarelli<sup>1</sup>, Luján Alvarez<sup>2</sup>, M Wagner<sup>3</sup>, A Gurni<sup>3</sup>, Cristina Carnovale<sup>2</sup>, Alejandra Luquita<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cátedra de Biofísica, Facultad de Ciencias Médicas, UNR;

<sup>2</sup> IFISE-Cátedra de Fisiología, Facultad de Ciencias Bioquímica y Farmacia, UNR; <sup>3</sup> Cátedra de Farmacobiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Lc es una planta hemiparásita argentina de conocida acción farmacológica. **Objetivo:** analizar factores determinantes del comportamiento reológico de la sangre y evaluar la capacidad funcional hepática frente al tratamiento con Lc. **Métodos:** Ratas Wistar machos adultos fueron divididas en 2 grupos: Control (C) (n=6); tratadas (T) (n=6). T recibieron 2,5 mg/100 g . PC i.p. de Lc cada 24 hs. durante 3 días. **Resultados:** En el grupo T se observó: 1) aumento significativo de viscosidad sanguínea ( $\eta_s$ ) corregida a un hematocrito del 45% (C:  $4.65 \pm 0.41$ ; T:  $8.20 \pm 0.86$  \*;  $p < 0.01$ ) y disminución del volumen corpuscular medio (VCM)  $\mu^3$  (C:  $61.29 \pm 1.24$ ; T:  $50.66 \pm 1.59$  \*  $\mu^3$ ;  $p < 0.01$ ), ambas variaciones estuvieron correlacionadas (rs:  $-0.66$ ;  $p < 0.05$ ). El aumento del índice de rigidez eritrocitaria correlacionó con la disminución del VCM (rs:  $-0.75$ ;  $p = 0.01$ ). Existió correlación entre el descenso de colesterol (Co) plasmático y el incremento de rigidez eritrocitaria (rs:  $-0.65$   $p < 0.05$ ); 2) aumentos significativos de: flujo biliar (C:  $1.59 \pm 0.12$ ; T:  $2.30 \pm 0.03$  \*  $\mu\text{l}/\text{min.g.hig.}$ ;  $p < 0.05$ ); velocidad de excreción biliar de Co (C:  $7.94 \pm 0.82$ ; T:  $12.84 \pm 0.91$  \*  $\mu\text{mol}/\text{min.g.hig.}$ ;  $p < 0.05$ ) y velocidad de excreción biliar de sales biliares (C:  $50.5 \pm 5.8$ ; T:  $87.5 \pm 10$  \*  $\text{nmol}/\text{min.g.hig.}$ ;  $p < 0.05$ ). **Conclusión:** Lc disminuye Co plasmático, aumenta  $\eta_s$  y excreción biliar de Co y sales biliares.

- 282. Estrés oxidativo causado por la o-naftoquinona CG 10-248 en hepatocitos aislados de rata.** Patricia Carrizo, Marta Dubin, Silvia Fernández Villamil, María Molina Portela, A Stoppani.

*CIBIERG-CONICET, Facultad de Medicina, UBA*

Diversas quinonas lipofílicas, en particular la  $\beta$ -lapachona, han sido propuestas como citostáticos. Para evaluar la posible citotoxicidad de las mismas, se estudió la acción de CG 10-248 (CG), análoga de la  $\beta$ -lapachona, sobre diferentes parámetros bioquímicos en hepatocitos aislados de rata. Los niveles de  $\text{NAD}^+$  ( $\text{nmol}/10^6$  células) fueron ( $X \pm \text{E.S.}$ ):  $5.74 \pm 0.45$  ( $t = 0$  min;  $n = 19$ ). La adición de CG  $100 \mu\text{M}$  produjo una caída en los niveles de  $\text{NAD}^+$  a partir de los 5 min, siendo máxima a los 15 min. ( $3.76 \pm 0.38$ ;  $n = 18$ ). Simultáneamente, se detectó una rápida disminución de los niveles de GSH (75%; 5 min.), acompañada por un aumento en los niveles de GSSG. CG incrementó el consumo de  $\text{O}_2$  de los hepatocitos en presencia de antimicina. La actividad catalasa y la viabilidad celular no fueron modificadas significativamente en presencia de CG, mientras que la peroxidación de lípidos fue inhibida. Los cambios hallados en los niveles de  $\text{NAD}^+$  se atribuirían a la interconversión de nucleótidos de piridina [ $\text{NAD(H)} - \text{NADP(H)}$ ]. Todos los efectos observados evidencian reacciones metabólicas tendientes a contrarrestar los efectos del estrés oxidativo causado por el ciclo redox de la o-naftoquinona lipofílica CG.

- 283. Distribución de ácido paraaminohipúrico en diferentes tejidos de rata adulta de ambos sexos.** Jorgelina Cerrutti<sup>(\*)</sup>, Adriana M. Torres

*Farmacología, Facultad de Ciencias Bioquímica y Farmacia (\*) Facultad de Ciencias Veterinarias, UNR-CONICET, Rosario*

Se ha descrito que existe una diferencia ligada al sexo en la farmacocinética de algunas drogas. El objetivo de este trabajo fue estudiar la distribución de ácido paraaminohipúrico (PAH) y de su metabolito acetilado (PAAH) en hígado, riñón y cerebro de ratas Wistar adultas machos (M, n=6) y hembras (H, n=6). Se administró a ambos grupos de animales, una dosis única de PAH (0.3 mg/kg p.c.; i.v.). A los cinco minutos se extrajo sangre de arteria femoral y se obtuvieron muestras de cerebro, hígado y riñón. Se determinó el contenido de PAH por fotolorimetría antes y después de hidrólisis ácida. Se obtuvieron los siguientes resultados: Contenido de PAH (mg%) en plasma (PAH:  $M = 4 \pm 1$ ,  $H = 7 \pm 1$ ; no se detectó PAAH). Contenido de PAH y PAAH en tejido (ug/g de tejido): Cerebro (PAH:  $M = 2.2 \pm 0.1$ ;  $H = 2.7 \pm 0.5$ ; PAAH:  $M = 21 \pm 1$ ,  $H = 18 \pm 1$ ); Hígado (PAH:  $M = 11 \pm 2$ ;  $H = 11 \pm 0.5$ ; PAAH:  $M = 23 \pm 2$ ,  $H = 22 \pm 2$ ); Riñón (PAH:  $M = 1194 \pm 78$ ;  $H$

= 848 ± 87, P < 0.05; PAAH: M = 75 ± 14, H = 68 ± 12). Conclusiones: 1.- el riñón acumula mayor cantidad de PAH y PAAH que los otros tejidos estudiados, 2.- las ratas machos acumulan mayor cantidad de PAH en tejido renal que las hembras, 3.- en hígado y cerebro de ambos sexos predomina el metabolito acetilado a diferencia de lo que ocurre en riñón.

**284. Acción del Enalapril y Losartan sobre la excreción urinaria de albumina en nefropatía hiperoxalúrica.** Jorge Toblli, M Costa, M Angerosa, L Ferder, F Inserra

*Laboratorio de Medicina Experimental, Hospital Alemán & CIMAE, Buenos Aires*

Los IECA (inhibidor enzima convertidora de angiotensina) y bloqueantes AT<sub>1</sub> demostraron disminuir la excreción urinaria de albúmina (EUA) en diferentes nefropatías. El objetivo en este estudio fue determinar el efecto de enalapril (E) y losartan (L) sobre la EUA en ratas con daño tubulointersticial (TI) por oxalatos (Ox.) utilizando etilenglicol (ETG). Machos SD adultos, G1) control (n=6), G2) ETG (n=6), G3) ETG+E (n=6), G4) E (n=6), G5) ETG+L (n=6), G6) L (n=6). G1 con agua común. G2, G3 y G5 con ETG 1%, G3 y G4 con E (20mg/L) en el agua. G5 y G6 con L 10mg/kg/día por sonda, durante cuatro semanas. Días 1 y 28 se registró la presión arterial por "tail-cuff" y se recolectó orina de 24hr. para EUA (concentración con ultrafree-MC NMWL 5000 y anti-albumina de rata por inmunodifusión radial) y Ox. Los riñones fueron procesados para M.O. y monoclonal anti- $\alpha$ -actina ( $\alpha$ -SMA). El daño TI se graduó semi cuantitativamente. Se determinó % de  $\alpha$ -SMA en TI renal con analizador de imágenes. Día 28: (x ± sem): 1)EUA (mg/día) \* G1: 0 ± 0; G2: 25 ± 2; G3: 8 ± 2; G4: 0 ± 0; G5: 82 ± 26; G6: 0 ± 0. \* p<0,025 G3 vs G2 & G5. 2)El score de daño TI fue menor en G3 que en G2 y G5 (p<0,05) al igual que el % de  $\alpha$ -SMA (p< 0,025). Conclusiones: 1)E mejora la EUA en este modelo de daño TI. 2) L parece no compartir este efecto, al menos en esta dosis.

**285. Efecto del enalapril sobre la inmunoexpresión de transforming growth factor- $\beta$ , y colágeno tipo III en ratas hiperoxalúricas.** Jorge Toblli, I Stella, M Angerosa, C Nyberg, L Ferder, F Inserra

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

El transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) estimula la síntesis de colágeno, y está involucrado en inflamación y fibrosis. En varios modelos animales enalapril (E) mostró protección contra el daño tubulointersticial (TI). Nuestro objetivo fue evaluar el efecto de E sobre la expresión de TGF- $\beta$  y colágeno III (COL III) en ratas hiperoxalúricas (Hox.) con daño TI. Machos SD adultos. G1) control (n=6), G2)Hox. (n=6), G3)Hox.+ E (n=6), G4)E (n=6). Durante 4 semanas, G1 con agua común G2 y G3 con etilenglicol 1%, precursor de oxalato, y G3 y G4 con E (20mg/L), ambos en el agua de beber. El tejido renal fue procesado para MO. e inmunomarcación. Se efectuó: monoclonal anti-TGF- $\beta$ , y antiCOL III, evaluando el % de TGF- $\beta$  y COL III en área TI. Al finalizar el experimento G2 y G3 mostraron un significativo incremento en la excreción de oxalato urinario (p<0,01). 1)% de TGF- $\beta$  (x ± sem) G1= 3,8 ± 1,1; G2=13,3 ± 2,1\*; G3=3,3 ± 1; G4=5,3 ± 2,1. 2) % COLIII, G1= 0,3 ± 0,2; G2=7 ± 2,6#; G3= 0,7 ± 0,4; G4= 0,3 ± 0,3. \*p< 0,01 =G2 vs. G1, G3, G4; #p<0,01= G2 vs. G1, G3, G4. E al mostrar un menor y significativo % tanto de TGF- $\beta$ , como de COL III, interferiría en la producción de matriz extracelular en ratas Hox. con daño TI.

## NEUROCIENCIAS I

**286. Efecto dual de dexametasona (DEX) en neuronas nociceptivas ya-motoneuronas post-injuria de la médula espinal (ME).** Susana González, Claudia González Deniselle, Analía Lima, AF De Nicola.

*IBYME-CONICET y Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA.*

La colina acetiltransferasa (ChAT) es un parámetro de viabilidad funcional de motoneuronas, mientras que el óxido nítrico (NO) está involucrado en el procesamiento de información nociceptiva en neuronas de la ME. Se describe, primero, el efecto de DEX sobre ChAT en motoneuronas de Lámina IX (LIX) en la ME lesionada, comparando la intensidad de la inmunoreacción (ILIGV/área) en cortes de ME intacta y de animales con transección (TRX) a nivel torácico. Ambos grupos recibieron vehículo o DEX (5mg/kg) durante 48 hs. La TRX disminuyó 50% el valor ILIGV/área con respecto al grupo control (TRX:0.406±0.02 vs. Control:0.816±0.04 p<0.01), en tanto DEX fue capaz de revertir el efecto causado por la lesión (TRX+DEX:0.690±0.103 p<0.05 vs TRX). Segundo, DEX disminuyó el número de neuronas NADPH-diaforasa activas en LX, asociadas con producción de NO y transmisión de dolor (TRX:8.9±0.9 vs TRX+DEX:3.6±0.4 p<0.01). En la literatura, la aparición de neuronas NADPH-diaforasa activas en la ME se relaciona con respuesta a hiperalgesia. Sugerimos que DEX ejerce un efecto neuroprotector sobre  $\alpha$ -motoneuronas, atenuando además la reacción hiperalgesica en la fase aguda de la lesión. (Subsidiado por PIP 4103, CONICET y TM13, UBA)

**287. Progesterona (P4) produce cambios en la distribución astrocitaria de la NADPH-diaforasa en la médula espinal transectada (TRX).** Florencia Labombarda, Susana Gonzalez, Analía Lima, Paulina Roig, M Schumacher, A.F. De Nicola.

*IBYME, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UBA e INSERM U488, Paris, Francia.*

La P4 posee efectos neurotróficos sobre el sistema nervioso. En este trabajo estudiamos la actividad de NADPH-diaforasa, como índice de la óxido nítrico sintetasa, en astrocitos del cordón lateral de médula espinal de ratas intactas y con TRX torácica, con y sin tratamiento con P4 (4mg/kg/día x 3 días s.c.). La histoquímica fue realizada debajo de TRX, cuantificándose por densitometría computarizada el número y área de astrocitos/0.1 mm<sup>2</sup> que expresaban actividad de NADPH-diaforasa. El número total de astrocitos positivos en TRX+P4 (60.25 ± 6.76) fue mayor que los grupos: control (30.11 ± 1.39), control+P4 (39.16 ± 6.9) y TRX (34.20 ± 5.22) (p<0.01, ANOVA y Newman-Keuls). Asimismo, P4 indujo redistribución de astrocitos NADPH-diaforasa reactivos en TRX pero no en intactos, aumentando los de áreas 10-25  $\mu$ m<sup>2</sup> (28.5 ± 2.11 vs. 17.4 ± 2.50, p<0.05) y 61-130  $\mu$ m<sup>2</sup> (7.75 ± 1.43 vs. 2.0 ± 0.31, p<0.01) pero no intermedios. P4 modula el número de astrocitos NADPH-diaforasa reactivos, favoreciendo la diferenciación hacia formas estrelladas bajo el estímulo condicionante de TRX. Es posible que estos mecanismos se relacionen con la regeneración y la reparación de la médula espinal lesionada.

**288. Receptores para oxitocina en la médula espinal lumbar de animales con hipogonadismo funcional.** M Cristina Vega, Verónica C Engrassi, H Coirini

*Laboratorio de Neurobiología, IBYME y Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA.*

Estudios funcionales indican al neuropéptido oxitocina (OT) como el compuesto mas potente en la estimulación de la erección peneana. Previamente demostramos la presencia de OT inmunoreactiva sobre los núcleos dimórficos de la médula espinal (SNB) involucrados en esta respuesta. En el presente trabajo informamos la distribución y densidad de receptores para OT (OTr), analizados por autoradiografía cuantitativa, en animales: controles (C; n=6) y con tratamiento neonatal con monosodio glutamato (MSG; n=6). Bajos niveles de unión del ligando específico [<sup>125</sup>I]-OVTa fueron detectados en las láminas I y II de la región L6 en la médula espinal de C: 1,19±0,13 fmoles/ mg. Una disminución significativa de OTr se observó en MSG: 0,63±0,15 fmoles/mg; p< 0.05 (t-test). Resultados similares fueron encontrados en hipotálamo medio basal, C: 12,8±1,2 vs. MSG: 8,4±0,7 fmol/mg;

$p < 0.02$  (t-test). Análisis morfológicos del SNB mostraron una disminución significativa de su volumen en MSG  $p < 0.05$  (t-test), sin que se produjeran alteraciones en los histogramas de frecuencia de motoneuronas vs tamaño. La presencia de terminales conteniendo OT en las láminas I y II, y la sensibilidad a OT de ésta región indican que estos sitios de unión, representan receptores funcionales que podrían estar relacionados con la respuesta a la producción local de OT previo o durante los estímulos ex-cópula. (PMT-PICT-0410)

**289. Respuesta del núcleo subtalámico a la estimulación de receptores dopaminérgicos estriatales.** AM Santangelo, JE Belforte, K Tseng, JH Pazo

*Facultad de Medicina, UBA*

El núcleo subtalámico (ST) es considerado un estructura clave en la fisiología y fisiopatología de los ganglios basales. En el Parkinson la inactivación del núcleo mejora los signos motores. Nuestro interés fue analizar las respuestas de las neuronas del ST, en animales normales, a la activación de los receptores dopaminérgicos estriatales. Los experimentos se realizaron en ratas anestesiadas con uretano. El registro se hizo con micropipetas de vidrio y la estimulación de los receptores con microinyecciones intraestriatales (0,5  $\mu$ l). Las neuronas del subtalámico responden a la inyección intraestriatal de apomorfina (10  $\mu$ g). La mayoría con una inhibición temprana (lat.4,30 $\pm$ 1 min, 65 $\pm$ 8.8%,  $p < 0.001$ , n=12) y otra tardía de menor intensidad (lat.20 $\pm$ 3 min, 44 $\pm$ 9.7%,  $p < 0.01$ ). Las restantes con excitación, cuya latencia es 7 $\pm$ 1.45 min. La frecuencia basal de 5.05 $\pm$ 0.75 pasa a 9.95 $\pm$ 2.7 Hz ( $p < 0.05$ , n=6). Lo anterior pone de manifiesto que la activación de los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> tiene una acción bifásica sobre la actividad del ST. Esto en cierta medida se desvía del modelo funcional propuesto para los ganglios basales.

**290. Modulación estriatal de la sensibilidad nociceptiva dentaria.** JE Belforte, AC Barceló, AM Santangelo, JH Pazo

*Facultad de Medicina y Odontología, UBA.*

Recientes estudios indican una participación de los Ganglios de la Base en el procesamiento de las sensaciones nociceptivas y en los mecanismos de analgesia endógena. Con el objeto de caracterizar la modulación de la sensibilidad nociceptiva trigeminal por parte del estriado se estudió en ratas anestesiadas con Uretano la amplitud del reflejo de abertura bucal (RAB) y la actividad de las neuronas sensoriales por estímulos dentarios en los incisivos inferiores. Para ello se estimuló la pulpa dental y se midió la amplitud pico a pico en la respuesta del músculo digástrico como medida del RAB, al mismo tiempo se registró la actividad unitaria espontánea y la evocada por la estimulación dental, en neuronas sensoriales del subnúcleo caudal del Trigémino. La estimulación del Estriado se logró micro-inyectando L-glutamato (163 nmol/0.5  $\mu$ l) en diferentes posiciones, siendo muchas de ellas capaces de inhibir significativamente ( $p < 0.05$ ), tanto la respuesta del RAB como la actividad evocada de neuronas sensoriales (8.18 $\pm$ 1.7 Hz vs 2.35 $\pm$ 1.3 Hz, con glutamato,  $p < 0.001$ ). Se encontraron también sitios capaces de facilitar la respuesta al estímulo dentario. De lo anterior concluimos que el estriado de la rata estaría involucrado en los mecanismos de analgesia endógena.

**291. Canales de calcio voltaje dependientes de tipo L desmascarados por la acción de DM-BAPTA-AM (Bp) FJ Urbano, RS Depetris, MD Rosato-Siri, OD Uchitel**

*Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular (LFBM); Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA*

En el presente trabajo evaluamos el rol de los canales de calcio voltaje dependientes (CCVD) en la placa neuromuscular (PN) del músculo *levator auris* de ratón adulto incubada con DM-BAPTA-AM (Bp) y EGTA-AM (Eg). El antagonista de los CCVD de tipo L, nitrendipina, redujo (23 $\pm$ 9%, n=5) las I<sub>Ca</sub> perineurales de las PN incubadas con Bp, pero no de las incubadas con Eg.

Además, luego del bloqueo de los CCVD tipo P/Q, la nitrendipina abolió (>90%, n=2) la I<sub>Ca</sub> restante en las PN incubadas con Bp. Esta reducción no se observó en las PN incubadas con DMSO o Eg, tanto antes como después del bloqueo de los CCVD tipo P/Q. Sin embargo, aunque la nitrendipina no redujo el contenido cufntico de las PN incubadas con Bp, el aumento observado en la frecuencia espontánea de MEPPs tras la aplicación del agonista Bay K 8644 a las PN incubadas con Bp fue significativamente mayor ( $p < 0.0001$ ) que el aumento observado en las PN incubadas con DMSO o Eg. En conclusión, estos resultados sugieren que la incubación de las PN de ratón adulto con Bp es capaz de desenmascarar una población de CCVD tipo L presentes en las terminales.

**292. La fotoestimulación de células mononucleares periféricas humanas (CMPH) libera una sustancia que activa el sistema nervioso autónomo.** Ana Bedoya, JD Goldstein, Silvina Raiden, Yanina Pereyra, G Guilgur, M Fourcade, VE Nahmod

*Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, UBA*

La fotoestimulación extrasensorial humana produce una disminución de los niveles de melatonina circulante que ha sido atribuida recientemente a la hemoglobina (Science 1998). En un trabajo previo habíamos observado que la fotoestimulación de CMPH induce la síntesis de serotonina e inhibe la de melatonina. Sobrenadantes de cultivos de CMPH, en presencia o ausencia de luz, se inyectaron, por vía endovenosa, a ratas Wistar conectadas a un polígrafo para el control de la frecuencia cardíaca (FC) y de la presión arterial media (PAM). Los controles tuvieron una FC de 240 $\pm$ 5 latidos/minuto y una PAM de 90 $\pm$ 3 mm Hg. Los sobrenadantes de las células foto-estimuladas (CF), en dosis de 200  $\mu$ l y 400  $\mu$ l, aumentaron en forma significativa y durante 5 minutos, la FC a 270 $\pm$ 6 y 285 $\pm$ 3 latidos/minuto, y la PAM a 100 $\pm$ 2 y 105 $\pm$ 3 mm Hg respectivamente, ( $p < 0.01$ ). Los sobrenadantes de las células mantenidas en oscuridad (CO) disminuyeron significativamente la FC a 210 $\pm$ 5 y 195 $\pm$ 3 latidos/minuto y la PAM a 80 $\pm$ 2 y 60 $\pm$ 5 mm Hg respectivamente, ( $p < 0.01$ ). Conclusión: una sustancia liberada por las CMPH durante la fotoestimulación activa el simpático y otra, durante la oscuridad, lo inhibe.

**293. Estudios sobre la reproducción en ratas hipoprolactinémicas (ifl-nu).** GA Jahn, R Cabrera\*, C Bregonzio\*, RP Deis

*LARLAC-CRICYT y \*LINCE-CRICYT, Mendoza*

Las ratas IFL Nu son hipoprolactinémicas y tienen lactancia insuficiente. Estudiamos los parámetros endócrinos en estas ratas para determinar las razones de su insuficiencia lactacional, usando ratas Wistar como controles. Todas las hormonas se midieron por RIA. Observamos niveles bajos de PRL en el día 5 (66 $\pm$ 12 vs 179 $\pm$ 47 ng/ml en Wistar,  $p < 0.02$ ) y de Pg en los días 5 (101 $\pm$ 9 vs 145 $\pm$ 11 ng/ml,  $p < 0.01$ ) y 10 (77 $\pm$ 7 vs 111 $\pm$ 15 ng/ml,  $p < 0.05$ ) de gestación en las ratas IFL, sin diferencias más adelante. Los niveles de GH fueron normales, y el estradiol disminuyó en el día 19 (4.3 $\pm$ 0.5 vs 11 $\pm$ 2.3 pg/ml,  $p < 0.02$ ). La gestación y el parto fueron normales, pero el 20% de las madres no tuvo lactancia y el 60% tuvo lactancia parcial. En respuesta a la succión, las madres IFL liberaron menos PRL (213 $\pm$ 42 vs 408 $\pm$ 39 ng/ml,  $p < 0.01$ ) y sus crías obtuvieron menos leche (estimada por el aumento de peso de las crías durante 30 min de succión) que las madres Wistar. El aumento de PRL después de la caída de Pg que ocurre 24 h después de dos inyecciones de PGF2 $\alpha$  (0.15 mg/rata s.c. a las 8:00 y 12:00 h del día 19 de preñez), fue similar en las ratas IFL y Wistar, pero en las Wistar el tono dopaminérgico en EM cayó, mientras que en las ratas IFL aumentó sugiriendo activación exagerada del retrocontrol negativo de PRL sobre el sistema dopaminérgico. Los resultados sugieren que fallas en la regulación de la secreción de PRL en las ratas IFL posiblemente

por supersensibilidad de la respuesta dopaminérgica causarían la falla en la lactancia.

**294. Moléculas bioactivas en la denoides hipertrofica infantil.**  
Angela M Suburo, JM Figueroa, EJ Mansilla

*FCB, Universidad Austral; IDNEU y Hospital de Clínicas, UBA*

La hipertrofia adenoidea es frecuente en la infancia y se asocia con alergia e inflamación local, patología del oído medio y sintomatología bronquial. Además de su conocido papel en la respuesta inmune, las adenoides podrían constituir otro de los eslabones del gran circuito-inmuno-endocrinológico. Para analizar estas funciones se estudió la presencia de inmunoreactividad (IR) para: neuropéptido Y (NPY), substancia P (SP), péptido intestinal vasoactivo (VIP), péptido relacionado con la calcitonina (CGRP), sintasas de NO neuronal (NOSn) y endotelial (NOSe) y neurofilamentos, en cortes de adenoides obtenidas por cirugía. Se detectó IR para todos los neuropéptidos y NOSe en una gran proporción de células epiteliales, así como en diversas células del estroma, incluyendo algunas de forma dendrítica. En estas últimas también se observó IR para NOSn y neurofilamentos. Los nervios, habitualmente asociados a vasos, fueron identificados por su IR para NPY y neurofilamentos. Las moléculas bioactivas detectadas podrían participar en la regulación intrínseca de las adenoides. Además, transportadas por el medio aéreo o fluido circundante, podrían actuar a distancia sobre las mucosas del oído medio y las vías respiratorias.

**295. Efectos Clínicos del Cambio de Antipsicóticos Típicos a Antipsicóticos Atípicos Antagonistas D2-5HTA2. Risperidona y Clozapina en Pacientes con Trastornos Esquizofrénicos Hospitalizados.** NM Zelaschi, S Gaitán, SO Panizzo, AB Sobrero, AE López, JL Rodriguez, FM Archuby  
*Hospital Neuropsiquiátrico A. Korn, Facultad de Medicina, UNLP, La Plata*

En este estudio mostramos evidencia de los efectos clínicos observados tras la sustitución completa de antipsicóticos típicos por antagonistas atípicos (ATP) D2-5HTA2, Risperidona (Ris) y Clozapina (Cz), en esquizofrénicos hospitalizados. Se estudiaron 23 pacientes esquizofrénicos hospitalizados (Criterio DSM IV) con la escala CGI (Clínica Global Impression) para evaluar la evolución de los síntomas psicóticos y de recaída (criterio operacional previamente validado). Los pacientes que responden a bajas dosis de APT fueron asignados a Ris y los resistentes a APT (criterio de KANE 1988) a Cz. Se valoró mensualmente durante un año la evolución clínica. Se utilizó prueba de  $X^2$  para comparar éxitos vs fracasos ( $x \pm DS$ ). De los 23 pacientes,  $x$  edad, 14 se asignaron a Ris ( $56 \pm 12$  años) y 9 para Cz: ( $40 \pm 7$  años); el rango de dosis diaria fue: Ris: 2-5 mg y Cz: 150-500 mg. Con Ris, 9 respondieron y 5 recayeron; con Cz 8 respondieron y 1 salió del estudio por neutropenia ( $X^2 = 4.12$  para  $\alpha = .05$  ns). Cuando los fracasos se analizaron en relación con el APT haloperidol tampoco se hallaron diferencias. Opción A: Cz  $\rightarrow$  Ris ( $n=2$ - fracasos=2); Opción B: Ris  $\rightarrow$  Cz ( $n=2$ - fracasos=1); Opción C: Ris  $\rightarrow$  Haloperidol ( $n=3$  - fracasos= 0); ( $x^2=4.95$  ns para  $\alpha = .05$ ). Los resultados de este estudio sugieren un patrón de respuesta clínica similar con los antagonistas D2-5 HTA2 los que podrían sustituir a los clásicos APT antagonistas D2.

**296. Anticuerpos anti-gangliosidos (IgM anti-GD1b, anti-GT1b y anti-GD3 e IgG anti-GD1a) en dos pacientes con neuropatía crónica atáxica.** AM Villa, PP Lopez, GH Nores, G Sevelever, OP Sanz, REP Sica

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

El objetivo de este trabajo es mostrar la existencia de anticuerpos antigangliosidos IgM anti-GD1b, GT1b y GD3 en un

paciente e IgG anti-GD1a en otro. Ambos con igual cuadro clínico, electrofisiológico e histopatológico compatible con neuropatía crónica atáxica. Los anticuerpos antigangliosidos de la serie b que contienen un grupo disialico (DS) en su molécula han sido asociados a neuropatías inmuno-mediadas crónicas atáxicas, considerando a DS como el blanco antigenico. Se presentan dos pacientes con historia de parestesias y ataxia de los cuatro miembros, arreflexia y alteración de todas sus modalidades sensoriales. El LCR mostró aumento de proteínas sin células. Un electromiograma exhibió una neuropatía periférica de tipo primariamente desmielinizante. La histopatología de ambos pacientes mostró desmielinización segmentaria sin signos de inflamación. Un rastreo sérico de anticuerpos antigangliosidos utilizando HPLC mostró inmuno-detección de anticuerpos IgM anti-GD1b, GT1b y GD3 en un paciente e IgG anti-GD1a en el restante. Como conclusión se demuestra la presencia de dos diferentes poblaciones de anticuerpos, en pacientes con similar cuadro clínico. La primera de ellas, reactiva contra los gangliosidos GD1b, GT1b y GD3, todos poseedores de un grupo disialico en su molécula y la segunda población contra el gangliosido GD1a, cuya estructura es similar a GT1b sin su grupo DS, considerado como antígeno-blanco de la enfermedad.

## POSTERS II

### INMUNOLOGIA BASICA Y CLINICA

**297. Unión de C3 con la forma fibrilar del amiloide  $\beta$  (A $\beta$ ).**  
Ester Saball, Marcela Salvarrey

*Area Inmunología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR, Rosario*

En estudios previos demostramos que la forma soluble de un péptido sintético de secuencia análoga al amiloide  $\beta$  del Alzheimer (A $\beta$  1-40), se une con C3 con una  $K_d = 7,5 \pm 0,8$  nM. Con el objeto de caracterizar la interacción de C3 con la forma fibrilar se agregó el péptido por incubación a 37°C una semana en PBS, inmovilizándolo sobre papel de nitrocelulosa y tiras de poliestireno que se incubaron con C3. En todos los casos el revelado se realizó con los monoclonales 6E10 (a-A $\beta$ 1-16) y 4G8 (a-A $\beta$ 17-24), y/o streptavidina-peroxidasa ó a-C3- peroxidasa. Por inmunoblotting se estudió la especificidad de la unión; por ELISA: a) se estimó la  $K_d$  ofreciendo cantidades crecientes de C3 y b) se estudió la naturaleza de la unión disociando la misma con 1M urea-1.5M NaCl e Hidroxilamina 1M pH=10. Los resultados experimentales indican que C3 se une específicamente a la forma agregada de A $\beta$  1-40 con una unión covalente hidroxilamino sensible y una  $K_d$  de  $780 \pm 120$  nM. Esto constituye una evidencia de que la forma fibrilar de A $\beta$  podría iniciar la activación por la vía alternativa del Sistema de Complemento a través del ataque nucleofílico del C3.

**298. El losartán, antagonista selectivo de los receptores AT1 para angiotensina II, inhibe el reclutamiento de neutrófilos en respuesta al FMLP.** Silvina Raiden, V. Nahmod, Yanina Pereira, Corina Gustavson, Clarisa Alvarez, J Geffner

*Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari; Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires*

Previamente mostramos que el losartán inhibe, *in vitro*, la unión del FMLP a su receptor en el neutrófilo. Aquí examinamos su capacidad de inhibir el reclutamiento de neutrófilos en pulmón inducido por instilación intratraqueal (it) de FMLP ( $10^{-6}$  M), en ratas wistar tratadas o no con losartán, por infusión endovenosa. Se observó una disminución en el contenido de mieloperoxidasa (MPO) en pulmón ( $\Delta$  Abs a 492 nM), por tratamiento con losartán: FMLP  $1138 \pm 185$ ,  $n=12$  vs FMLP+losartán 20 y 4  $\mu$ g/kg/min,

792±68 y 769±149, n=6, p<0.01. Otros antagonistas del sistema renina angiotensina: saralasin (10 µg/kg/min) y captopril (200 µg/kg/min) fueron inefectivos: Δ Abs=1139±85 y 1116±15, n=3. Empleando *Pseudomonas aeruginosa* por el encontramos también que el losartán 20 µg/kg/min previno el reclutamiento de neutrófilos: Δ Abs 2086±90 vs. 1013±129, controles vs tratados, n=3, p<0.05. Se sugiere que el losartán podría modular la respuesta inflamatoria aguda inducida por péptidos formilados bacterianos.

**299. Efecto inhibitorio del benznidazol (BZL) sobre la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos estimulados con lipopolisacáridos (LPS) y/o interferón gamma (IFN-γ).** E Piaggio, C Le Page, J Wietzerbin, O Bottasso, S Revelli

*Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR, Rosario; Unité 365, Institut Curie, Paris, Francia*

Estudios preliminares para evaluar si el BZL actúa sobre la funcionalidad de células hospederas del *T.cruzi* indican que esta droga reduce la producción de NO en macrófagos tratados con LPS. Dado que la síntesis de NO en macrófagos está controlada por la NO sintetasa inducible (iNOS) se estudió el efecto del BZL sobre la expresión del gen de la iNOS y la síntesis de NO. Se utilizaron macrófagos murinos (RAW 264.7) estimulados o no con LPS (100 ng/pozo), y/o IFN-γ (500 UI/pozo), tratados con BZL (en 2-metoxietanol) 0.1 mM, 0.5 mM, o 1mM/pozo. Los valores de NO<sub>2</sub> (media ± es, µM) en sobrenadante de 24 hs de cultivo fueron LPS 28.4±0.6, LPS+BZL (1mM) 3.7±0.7; LPS+IFN-γ 53±1.6, LPS+IFN-γ+BZL 18.4±0.5; IFN-γ 19.4 ±2.4, IFN-γ +BZL 4.5± 0.5 (p<0.001). En cultivos paralelos de 6 hs, las células se lisaron en TRIZOL, y se extrajo el ARN total. El aislamiento del ARN no degradado se verificó por electroforesis en minigeles y el ARNm específico se detectó por Northern-blot. Se hibridizó con una sonda de ADNc [<sup>32</sup>P] para el gen de la iNOS, se expuso a un analizador de imágenes y se visualizó por autoradiografía. El ARNm iNOS no se halló constitutivamente expresado en las células no estimuladas o tratadas con BZL. En aquellas estimuladas la inducción de la iNOS fue máxima en los cultivos con LPS+IFN-γ. El BZL causó una profunda reducción en la expresión del ARNm para la iNOS. El efecto inhibitorio del BZL sobre la síntesis de NO<sub>2</sub> se debería a una acción sobre la iNOS.

**300. Variaciones fenotípicas y funcionales de la inmunidad innata en un modelo experimental de candidiasis y estrés.** Cecilia Rodríguez, S Correa, P Iribarren, C Sotomayor

*Inmunología, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.*

La candidiasis es una infección provocada por un hongo oportunista que precede a desequilibrios en el sistema inmune. Para el desarrollo de nuestro modelo experimental y a fin de evaluar las modificaciones que ocurren durante el curso de esta infección asociada al estrés trabajamos con cuatro grupos de animales: Normales (N); Infectados(Ca)(3x10<sup>8</sup> lev/ml); Estresados (E)(sometidos a un esquema de estrés crónico variado durante 10 días); e Infectados y Estresados (CaE). El estrés recibido se evaluó mediante el nivel de glucocorticoides, variación del peso corporal y del peso de órganos como timo, bazo y riñón. La colonización del hongo evaluada por UFC fue mayor en el grupo CaE. Se detectaron cambios significativos en la células reclutadas a la cavidad peritoneal en el día 3 para el grupo Ca y en el día 10 se observaron cambios notables en Ca y CaE respecto al grupo E(p<0.001).El estudio de estas poblaciones se completó con el análisis morfológico, fenotípico y funcional. Considerando "light scatter"parametros (FW vs SS) se observaron alteraciones en los grupos Ca y CaE, sugiriendo distinto grado de activación. El monitoreo por FACS de marcadores como IA, ICAM y OX42 evidenciaron una modulación de la expresión asociado a la presencia de la levadura. El análisis de la capacidad fagocítica evaluada por FACS reveló una disminución del porcentaje de levaduras engolfadas en los grupos Ca y CaE (18 y 14%) respecto de los animales N (34,5%). La producción basal de ON por Mφ de los grupos infectados estuvo incrementada respecto de los grupos N y E(p<0.001), efecto que fue manifiesto lue-

go de la activación de los Mφ con LPS. Estos resultados muestran que el estrés modifica parámetros claves involucrados en la progresión de la infección.

**301. Respuesta neuro-inmuno-endócrina anormal en ratones knock-out para β-endorfina.** D Refojo<sup>1</sup>, D Kovalovsky<sup>1</sup>, J Young<sup>2</sup>, M Rubinstein<sup>2</sup>, M Low<sup>3</sup>, JMHM Reul<sup>4</sup>, F Holsboer<sup>4</sup>, E Arzt<sup>1,4</sup>.

*Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular (LFBM). Facultad de Ciencia Exactas y Naturales, UBA<sup>1</sup>; Ingebi-Conice<sup>2</sup>; Vollum Institute, Portland<sup>3</sup>; Max Planck Institute, Munich<sup>4</sup>*

Las relaciones existentes entre la β-endorfina y el sistema inmune han sido tan estudiadas como controversiales los resultados obtenidos. Estudiamos la proliferación de esplenocitos en cultivo y la respuesta adrenal en ratones C57BL/6 knock-out (KO) para la secuencia codificante de β-endorfina comparativamente con animales normales congénicos (Wild Type-WT). Los esplenocitos fueron estimulados con mitógenos selectivos para células B (LPS), células T (Con A) y células B-T (PWM) y su tasa de proliferación fue medida por incorporación de timidina tritiada. La respuesta mitogénica de animales KO (media ± SEM, cpm) Con A:43805 ± 2505, LPS: 16233 ± 4298, PWM: 24925 ± 125, fue significativamente (al menos p<0.05) mayor que en los WT: Con A:26150 ± 5350, LPS: 4650 ± 1150; PWM:13512 ± 955. La respuesta de corticosterona a la administración periférica de LPS (250 µg/ml, i.p) muestra que el pico del corticoide en los animales KO (media ± SEM, ng/ml): 35 ± 13.3 es menor que en los WT: 642 ± 122 (p<0.01).La ausencia de β-endorfina en estos ratones genera una mayor actividad mitogénica y concordantemente una respuesta del eje protector adrenal significativamente disminuida, lo cual facilitaría la respuesta antigénica. Podemos concluir que la β-endorfina cumpliría globalmente un papel inhibitorio en el desencadenamiento de la respuesta inmune.

**302. El factor estimulante de colonias granulocítico-macrofágico modula la apoptosis de células dendríticas (CD) inducida por diclorometileno difosfato asociado a liposomas (L-DMP).** GA Rabinovich, Clelia M Riera, P Iribarren

*Inmunología, Departamento Bioquímica Clínica, Facultad Ciencias Químicas, U.N.Cba.*

El L-MDP elimina células macrofágicas por inducción selectiva de apoptosis. En el presente estudio se evaluó el efecto potencial de L-MDP sobre el umbral apoptótico de CD purificadas de bazo de ratas Wistar y cultivadas en ausencia o en presencia de L-MDP (25 mg/ml) durante 4 a 6 h. El L-MDP indujo fragmentación del DNA genómico en bandas oligonucleosomales de ~180-200 pb y la morfología ultraestructural típica de células apoptóticas. El ensayo de TUNEL adaptado para citometría de flujo reveló 49% de incorporación de deoxinucleótidos biotinilados con respecto a células cultivadas en ausencia de L-MDP (13%). Como el GM-CSF promueve la expansión y maduración de CD se cultivaron estas células con dicha citoquina durante 18 h. Las CD fueron luego tratadas con L-MDP por 4 o 6 h, observándose una reducción del patrón de fragmentación del DNA, y de los niveles de células TUNEL positivas en las células tratadas con GM-CSF. Este efecto protector correlacionó con una inducción de la expresión de Bcl-2 evaluada a través de ensayos de Western blot. La regulación del umbral apoptótico de CD permitiría estudiar e intervenir clínicamente procesos inmunológicos en los cuales estas células juegan un rol esencial.

**303. Células dendríticas: maduración y adhesión a endotelio.** CC Jancic, VP Lutzky, L Fainboim, HE Chuluyan

*Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires*

Las células dendríticas (DC) son las más eficientes células presentadoras de antígenos y juegan un papel crítico en la induc-

ción de la respuesta inmune. Existen evidencias de que el TNF $\alpha$  puede modular la capacidad de adhesión de DC modificando su estado de maduración. En estudios previos mostramos que las DC derivadas de monocitos son capaces de interactuar con células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC). El objetivo del presente trabajo fue estudiar las moléculas involucradas en la adhesión de DC a endotelio. Los monocitos de sangre periférica diferenciados a DC con IL-4 y GM-CSF durante 7 días mostraron una adhesión a HUVEC no activado del 45 $\pm$ 2% ( $p < 0.05$ ,  $n=3$ ). Esta adhesión fue parcialmente inhibida con mAbs contra CD29 y CD18. Las DC tratadas con TNF $\alpha$  presentaron mayor expresión de CD18, en tanto que CD29 no se modificó. Sin embargo, este aumento en la expresión de CD18 no se ve reflejado en un aumento en la adhesión. Por el contrario, DC tratadas con TNF $\alpha$  mostraron menor adhesión a HUVEC no activado (37 $\pm$ 2%;  $p < 0.05$ ,  $n=3$ ). Estos resultados sugieren que las DC presentan distinto grado de adhesión dependiendo del estado de maduración, siendo las más maduras menos adherentes a endotelio no activado. Además, la adhesión de DC inmaduras es parcialmente dependiente de CD18 y CD29.

**304. El sistema mononuclear fagocítico regula la toxicidad por verocitotoxinas en un modelo murino de síndrome urémico hemolítico.** M Palermo, F Alves Rosa, M Beigier, N van Rooijen, MA Isturiz.

*Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires; Faculty of Medicine, Vrije Universiteit, Amsterdam.*

El síndrome urémico hemolítico (SUH) es una enfermedad asociada a infecciones por bacterias gram negativas productoras de verocitotoxinas (VT) y es la primera causa de disfunción renal en la infancia. El objetivo de este trabajo fue estudiar la participación del sistema mononuclear fagocítico (SMF) en la acción tóxica de la VT tipo 2 (VT<sub>2</sub>) y de factores coadyuvantes como los lipopolisacáridos (LPS) en un modelo murino. El SMF se inactivó por inyección i.v. de diclorometilendifosfonato encapsulado en liposomas (Cl<sub>2</sub>MDP) e inhibe funciones del SMF como el "clearance" de complejos inmunes. Doce ratones BALB/c por grupo fueron inyectados con a) VT<sub>2</sub>, b) VT<sub>2</sub>+LPS, c) VT<sub>2</sub>+Cl<sub>2</sub>MDP, d) VT<sub>2</sub>+LPS+Cl<sub>2</sub>MDP. La sobrevivencia en los grupos fue la siguiente: a) 25%, b) 8%, c) 67%, d) 58%. Los grupos c) y d) son significativamente diferentes de a) y b),  $p < 0.001$ . La acción del Cl<sub>2</sub>MDP se manifestó sólo si se inocula 72, 48 ó 24 h previo a la VT<sub>2</sub>, pero no con la inoculación simultánea o posterior. Por otra parte la toxicidad de la VT<sub>2</sub>, con o sin LPS, fue similar en ratones "nude" y BALB/c indicando la irrelevancia del compartimiento T en la acción de VT<sub>2</sub>. Los resultados obtenidos indican que el SMF juega un papel activo en la acción tóxica de la VT<sub>2</sub> sola, o en presencia de LPS, probablemente por la menor secreción de citoquinas por hígado y bazo.

**305. Generación de tolerancia a lipopolisacáridos bacterianos (LPS) por citoquinas inflamatorias.** M Vulcano, L Mari, M Beigier, M Palermo, MA Isturiz

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

La tolerancia a LPS es un mecanismo activo inducido por la inoculación de bajas concentraciones de LPS, que provoca una inhibición de la síntesis de determinadas citoquinas. La generación y/o ruptura de la tolerancia a LPS es un mecanismo fundamental en la fisiopatología del shock séptico, y en los múltiples mecanismos activados por LPS. El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia sobre la tolerancia a LPS de dos citoquinas de secreción temprana inducidas por los LPS: TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Grupos de 8 ratones BALB/c fueron inoculados con una dosis diaria, durante 3 días de: a) 0,1  $\mu$ g de TNF- $\alpha$ , b) 0,1  $\mu$ g de IL-1 $\beta$ , c) 0,1  $\mu$ g de TNF- $\alpha$  + 0,1  $\mu$ g de IL-1 $\alpha$ , d) 2  $\mu$ g de LPS, e) salina. En el cuarto día los animales fueron desafiados con una dosis letal de LPS (200  $\mu$ g/ratón). La mortalidad fue la siguiente: a) 100%, b)

25%, c) 0%, d) 0%, e) 100%. Debido a la temprana muerte en a) comparada con b) y e) se analizó si el TNF- $\alpha$  podía desactivar los mecanismos de tolerancia. Para ello, animales tolerantes a LPS y sensibilizados a la acción del TNF- $\alpha$  con 18  $\mu$ g de D-galactosamina fueron desafiados con 0,1  $\mu$ g de TNF- $\alpha$ . Los animales tolerantes sobrevivieron y en los controles la mortalidad fue de 100%. Se demuestra que dos citoquinas, de efectos antagónicos sobre la tolerancia a LPS, actúan sinérgicamente en la inducción de los mecanismos de tolerancia.

**306. Efecto proliferativo del factor de crecimiento semejante a la insulina tipo-1 (IGF-1) sobre linfocitos T (LT) a través de la síntesis de IL-2 y de la cadena  $\alpha$  de su receptor (CD25).** Verónica White \*, Adriana Galeano#, Mariana Brocardo\*, Roxana Schillaci\*.

*\*Instituto de Biología y Medicina Experimental; #Servicio de Patología del Sanatorio Mater Dei, Buenos Aires*

Hemos demostrado que la activación de LT produce una disminución en el receptor de IGF-1 previa a la síntesis de la IL-2 y a la expresión del CD25. En el presente trabajo se estudió el efecto del IGF-1 sobre la producción de IL-2 y la expresión de CD25 en LT lo largo de la estimulación. Para ello LT humanos se purificaron por roseteo y se cultivaron en medio sin suero con 2  $\mu$ g/ml PHA, determinándose la concentración de IL-2 por ELISA, la expresión de CD25 por citofluorometría y la proliferación por incorporación de timidina-<sup>3</sup>H (TdR). El porcentaje de células CD25+ resultó: 0h 11.94 $\pm$ 1.65, 6h 13.28 $\pm$ 1.92, 12 h 58 $\pm$ 7.99, 20 h 85.5 $\pm$ 3.85. El IGF-1 incrementó un 24 $\pm$ 4% a las 12 hs, observándose a las 20 hs diferencia en la intensidad de fluorescencia (+28 $\pm$ 8%,  $P < 0.05$ ). La producción de IL-2 a las 6 h osciló entre 7.1 $\pm$ 0.9 y 96.1 $\pm$ 9.9 pg/ml y a las 12 h entre 33.5 $\pm$ 3.6 y 532.3 $\pm$ 0.6 pg/ml. La presencia de IGF-1 aumentó la producción a las 6 h un 107.7  $\pm$  10.3 % ( $P < 0.001$ ) y a las 12 h un 63.3 $\pm$ 5.4 % ( $P < 0.001$ ); siendo, a las 48 hs, el incremento de TdR 124 $\pm$ 4 %. Los resultados sugieren que el IGF-1 aumenta la síntesis temprana de IL-2 y del CD25, optimizando de esta manera la proliferación de los LT.

**307. Efecto sinérgico de anticuerpos anti-CD24 en la proliferación inducida por IL2 sobre células mononucleares periféricas.** C Rosselot, GB Reyes, GV Salamone, AK Mendiguren, L Fainboim, M del C Salamone.

*Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires*

El antígeno HSA de ratón (homólogo al CD24 humano) se expresa transitoriamente en la membrana de linfocitos T (LT) activados y se encuentra involucrado en señales co-estimuladoras mediados por anticuerpos anti -CD3 + anti -CD28. La expresión en LT del antígeno CD24 humano, descripto inicialmente en linfocitos B y en granulocitos, presenta aún controversias. Previamente, hemos demostrado que esta molécula se expresa en la membrana de linfocitos T activados con una cinética particular que depende del epítope estudiado. En este trabajo evaluamos el efecto de los anticuerpos dirigidos contra el epítope proteico LAP (AcMo SWA11 y ML5) en la proliferación de células mononucleares periféricas (CMP) estimuladas: i) con anticuerpos anti CD3/CD28; ii) con IL2R. Los resultados obtenidos, de acuerdo al nivel de timidina <sup>3</sup>H incorporada, permitieron establecer que esta molécula presenta, también en humanos, un efecto sinérgico sobre CMP activadas vía CD3/CD28 ( $x \pm SEM$ ; AntiCD3/CD28: 51.643 $\pm$ 9949, AntiCD3/CD28/ SWA11: 75.240  $\pm$  4317). Por otra parte, cuando se evaluó el efecto producido por los anticuerpos sobre las CMP estimuladas con IL2R (20U/ml), los resultados demostraron un incremento estadísticamente significativo en la proliferación celular inducida por esta citoquina. ( $x \pm SEM$ ; IL2+AcMo irrelev.: 5873 $\pm$ 762; IL2+SWA11: 13146 $\pm$ 2860,  $p < 0.04$ ; IL2+ML5: 13530 $\pm$ 5032,  $p < 0.01$ ,  $N=7$ ). Se concluye entonces que esta molécula está involucrada en señales co-estimuladoras en humanos actuando por un mecanismo que involucra IL2.

**308. CD74 y CD85: antígenos involucrados en la proliferación alogeneica.** GB Reyes, C Rosselot, GV Salamone, AK Mendiguren, L Fainboim, M del C Salamone

*Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires*

Los antígenos CD74 y CD85 han sido descriptos inicialmente como moléculas expresadas en linfocitos B y células presentadoras de antígeno (CPA). Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que estos antígenos se expresan en la superficie de los linfocitos T (LT) activados y en el caso particular del antígeno CD85 en una pequeña subpoblación de linfocitos T circulantes ( $\leq 15\%$ ). En el presente trabajo analizamos los efectos de los anticuerpos, dirigidos contra estas moléculas (anti CD85: AcMo VMP55 y GHI/75, anti CD74: LN2 y BU45) en la proliferación celular mediada por cultivo mixto linfocitario (CML). Los resultados obtenidos, evaluados por la incorporación de timidina<sup>3</sup>H, demostraron que los AcMo anti CD85 y anti el epitope C-terminal de la molécula CD74 (LN2) tienen la capacidad de bloquear parcialmente el CML [(i) para CD85,  $x \pm$  SEM; CN= 23848 $\pm$ 2580, VMP55=1460 $\pm$ 266, GHI/75=1350 $\pm$ 221,  $p < 0,01$ , N=12; (ii) para CD74,  $x \pm$  SEM; CN=30058 $\pm$ 4311, LN2= 16906 $\pm$ 2338,  $p < 0,05$ , N=7]. Bloqueos unidireccionales permitieron establecer con el anticuerpo VMP55 que este comportamiento no se debe sólo al bloqueo de las moléculas CD85 expresadas en la superficie de las CPA, sino también a aquellas presentes en los LT ( $x \pm$  SEM; CN= 25006 $\pm$ 4696, células respondedoras + VMP55=8814 $\pm$  1893,  $p < 0,05$ , N=6). La adición de anticuerpos anti-CD74 luego de 0, 24, 48 y 72 de activación permitieron inducir un comportamiento similar para esta molécula. Se puede concluir entonces que ambos antígenos se encuentran involucrados en la proliferación mediada por CML.

**309. Detección de transcritos del antígeno CD1 en células mononucleares periféricas.** María del C Salamone, Gabriela V. Salamone, Ana K Mendiguren, M Barboza, L Fainboim

*Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, José de San Martín, Facultad de Medicina, UBA*

Los antígenos CD1 han sido descriptos inicialmente como moléculas expresadas en la membrana de linfocitos pre-T. Si bien ha sido reportada la detección del isotipo CD1c en linfocitos B maduros y del antígeno CD1a en células tímicas simples positivas CD4 y/o CD8 no se ha establecido la expresión de estas moléculas en linfocitos T periféricos en estado de reposo. En este trabajo nosotros estudiamos la expresión del antígeno CD1c en el citoplasma de linfocitos T circulantes. Los resultados obtenidos por RT-PCR sobre células mononucleares periféricas (CMP) de individuos normales, revelaron la presencia de transcritos de esta molécula en 9/9 casos analizados. Purificación de poblaciones de linfocitos B, monocitos y células T ( $\leq 95\%$  de pureza) permitieron establecer la presencia de estos transcritos en las tres poblaciones celulares. La estimulación de CMP con PHA (3/3), indujo un brusco descenso en los niveles de transcritos detectados luego de 18hr de cultivo, restableciéndose esta expresión posteriormente. Los resultados obtenidos por citometría de flujo de marcaciones citoplasmáticas de CMP en reposo, permitieron determinar la presencia de la molécula CD1c en el citoplasma celular, en niveles muy variables entre individuos. En el período comprendido entre las 5 y 21 hs de activación pudo detectarse una expresión transitoria de este antígeno en la membrana plasmática. Se puede concluir que transcritos del antígeno CD1c se encuentran constitutivamente presentes en linfocitos T en reposo y que el comportamiento detectado en etapas tempranas de la activación, indicarían que esta molécula estaría involucrada en mecanismos que regulan la activación celular mediada por PHA.

**310. Glucosilación de IgG in vivo durante una reacción de fase aguda.** Andrea Canellada, Ileana Malan Borel, Ricardo Margni

*IDEHU-CONICET-UBA, Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA*

Ha sido descripta una alteración en el patrón de glucosilación proteica durante una reacción de fase aguda. Aquí hemos evaluado el efecto de la respuesta inflamatoria producida por la administración (sc) de trementina, sobre la síntesis y glucosilación de IgG en rata, analizando sueros obtenidos a 24 h, 3 días, 7 días, y 15 días post inoculación. Trementina con y sin la administración 24 h antes de una dosis de dexametasona (vo), G4 y G1 respectivamente, disminuyó los niveles de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG2c, efecto que fue máximo a los 3 días post-inoculación para IgG2c e IgG2b. La sola administración de dexametasona (G3) no modificó los niveles de IgG. Las DO a 490 nm por ELISA a los 3 días fueron para IgG2b: control, 0.1860 $\pm$ 0.120; G1, 0.0983 $\pm$ 0.0099\*; G3, 0.1700 $\pm$ 0.0130; G4, 0.1007 $\pm$ 0.014\*. La glucosilación de IgG2a e IgG2b se determinó por fijación a ConA. Trementina incrementó el porcentaje de fijación de IgG a la lectina a 24 h y 3 días post inoculación. Los porcentajes para IgG2b 24 h: control, 30.30 $\pm$ 2.44; G1, 64.90 $\pm$ 5.00\*. Dexametasona (G3) o previo a trementina (G4), no modificó el % respecto al control. Para concluir, durante una inflamación aguda se produjo una disminución de la síntesis de IgG que no fue afectada por la administración de dexametasona, mientras que si lo fue el incremento en la fijación de IgG a ConA observado al administrar trementina. Estos resultados sugieren un rol de la síntesis y glucosilación de IgG en la modulación de la respuesta inflamatoria.

**311. Anticuerpos antiglobulinos rojos de carnero en *Bufo arenarum* intoxicado con plomo.** Carolina E Rosenberg<sup>1,2</sup>, MA Arrieta<sup>3</sup>, NE Fink<sup>3</sup>, A Salibián<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>CIC, <sup>2</sup>Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP, <sup>3</sup>Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, <sup>4</sup>Ecofisiología Aplicada, Universidad Nacional de Luján

Para evaluar el efecto del Pb sobre la inmunidad humoral se cuantificaron anticuerpos antiglobulinos rojos de carnero (AbGRC) en el sapo *B. arenarum* inyectados una vez por semana con 50 mg Pb.kg<sup>-1</sup>. Los animales (controles inyectados con acetato de Na, n=23; experimentales con acetato de Pb, n=18) fueron aclimatados 7 días a 20°C y fotoperíodo 12 D: 12N constante. Se obtuvo sangre por punción cardíaca a tiempo inicial y final (42 días). Los niveles de Pb en sangre entera (PbS, en mg/dl) se determinaron por EAA y los AbGRC séricos por ELISA. Los resultados se expresaron como  $x \pm$  DS. En los sapos inyectados con el metal [PbS=8.2 $\pm$ 2.2] hubo un aumento significativo ( $p < 0,014$ ) de los AbGRC (Abs 1/200=0.844 $\pm$ 0.254) con respecto al inicio del experimento (0.624 $\pm$ 0.257). En los controles [PbS=2.2 $\pm$ 1.0] no se observaron diferencias significativas entre la Abs final (0.946 $\pm$ 0.484) y la inicial (0.784 $\pm$ 0.383). No se encontraron correlaciones significativas entre PbS y AbGRC. Se concluye que el Pb estimula la producción de anticuerpos naturales en el modelo experimental estudiado.

**312. Estudio de la interacción del lactógeno placentario ovino (oPL) con receptores para hormona de crecimiento humana (hGH).** Silvia Longhi, Carlota Wolfenstein-Todel, Karina Gómez, Marta Miranda, Lilia Retegui

*IQUIFIB (UBA-CONICET) Facultad de Farmacia y Bioquímica. Buenos Aires.*

El oPL es una proteína que pertenece a la familia de las GH y las prolactinas (PRL). A pesar de que su homología de secuencia con la PRL ovina y con las GH es baja, el oPL presenta tanto actividad lactogénica como somatogénica, característica que comparte sólo con la hGH. El oPL no fue reconocido por un panel de anticuerpos monoclonales (MAb) ni por sueros policlonales anti-hGH, lo cual indica que las topografías antigénicas del oPL y la hGH son muy diferentes. El oPL inhibió completamente la unión de la hGH a receptores lactogénicos de células Nb2 y a receptores somatogénicos de hígado de conejo, mientras que sólo se unió

a una subpoblación de receptores lactogénicos de hígado de rata. Además, el ión  $Zn^{2+}$  afectó de manera similar la unión de ambas hormonas a receptores de células Nb2 y de hígado de conejo, aunque aumentó la unión de hGH e inhibió la del oPL a receptores de hígado de rata. Estos resultados, y los obtenidos con un MAb dirigido contra el receptor de hGH y PRL, sugieren que el oPL y la hGH se unen a diferentes sitios de los mismos receptores.

**313. Caracterización de epitopos crípticos y conformacionales del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).** Verónica J Marino\*, Aída Sterin-Prync\*, Alejandro Vidal\*, Lilia A Retegui\*, Leonor P Roguin\*

\*IQUIFIB (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica y \*BIOSIDUS S.A., Buenos Aires

El G-CSF es un factor de crecimiento hematopoyético que estimula la proliferación y diferenciación de células precursoras y maduras. Con el propósito de caracterizar su interacción con receptores, se utilizaron dos anticuerpos monoclonales (MAb) anti-G-CSF denominados 295 y 136. Los dos MAb reconocieron al G-CSF insolubilizado en placas de polivinilo. Sin embargo, sólo el MAb 295 reconoció a la proteína en solución e inhibió la unión del  $^{125}I$ -G-CSF a receptores de membranas de placenta humana. Para identificar la estructura del epítopo delimitado por los MAb se realizaron digestiones proteolíticas del G-CSF con diferentes endoproteinasas. Los fragmentos peptídicos obtenidos fueron separados por SDS-PAGE, transferidos a membranas de PVDF e incubados con los MAb. La secuencia de aminoácidos de algunos de estos fragmentos se determinó por degradación de Edman. Los resultados indicaron que el MAb 295 reconoció un epítopo conformacional probablemente involucrado en el dominio de unión a receptores y localizado en la secuencia 1-122 del G-CSF. Por otro lado, el MAb 136 reconocería un epítopo críptico comprendido entre los aminoácidos 23-93 o 23-98 de la citoquina.

**314. Actividad antiproliferativa de un péptido sintético del interferón  $\alpha$  (IFN  $\alpha$ ).** Viviana C Blank, Clara Peña, Lilia A Retegui, Leonor P Roguin

IQUIFIB (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica. Buenos Aires

Con el propósito de identificar el dominio del IFN involucrado en la unión a receptores, se sintetizó el péptido correspondiente a la secuencia 122-139 del IFN- $\alpha$ 2b y se estudió su efecto sobre la interacción IFN:receptor. Puesto que el péptido es hidrofóbico y presenta una cisteína en su secuencia, se estudió la posible presencia de agregados moleculares y/o dipéptidos por electroforesis en geles de poliacrilamida y cromatografía en Sephadex G-25. Los resultados demostraron que el porcentaje de especies de mayor peso molecular disminuyó significativamente cuando el péptido se disolvió en un medio disociante y en presencia de un agente reductor. Sólo cuando se ensayó en este medio, el péptido inhibió la unión de  $^{125}I$ -IFN- $\alpha$ 2b a receptores de membranas de células WISH (amnios humano) y la proliferación de las mismas. Los resultados indican que la región 122-139 del IFN $\alpha$ 2b estaría involucrada en el dominio de unión al receptor y en la expresión de la actividad antiproliferativa de la citoquina, y advierten sobre el empleo de condiciones experimentales adecuadas para determinar la actividad biológica de péptidos.

**315. Efecto de sobrenadantes de cultivo placentarios murinos (SP) sobre la síntesis de hsp70.** S Miranda, T Gentile, S Vidueiro, R Margni

IDEHU (CONICET-UBA), Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

En trabajos previos hemos demostrado que SP murinos inducían *in vitro* un aumento en el número de moléculas asimétricamente glucosiladas. El objeto del presente trabajo es dilucidar si las moléculas hsp70, relacionadas a procesos de plegamiento y glucosilación de proteínas, están involucradas en este me-

canismo. Para ello se han obtenido SP de la crucea AKR $\times$ AKR - hembras múltiparas: 3-4 partos- (n=3), de máximo efecto glucosilante. Dichos SP fueron adicionados al 5% a cultivos de hibridomas 112B4 y 112D3(4x10<sup>6</sup>/ml) productores de mAbs. anti-DNP simétricos y asimétricos y cultivados durante 72 hs. La actividad anti-DNP y la proporción de moléculas asimétricas en los sobrenadantes de cultivo fue analizada empleando la técnica de ELISA antes y después de adsorber las moléculas glucosiladas por cromatografía de afinidad con Sepharosa-ConA. Las células (10<sup>6</sup>) fueron lisadas por sonicación. La presencia de hsp70 en el producto lítico obtenido fue investigada empleando la técnica de dot-blot utilizando mAb a-hsp72/73, un sistema avidina-biotina específico y revelado por quimioluminiscencia. Como control de inducción de hsp70 las células del hibridoma fueron sometidas a un estímulo térmico (42°C, 60min) y como control de revelado se empleó hsp70 comercial. Los resultados obtenidos mostraron que ambos hibridomas en ausencia de SP, no expresan hsp70, mientras que dos de los SP empleados, cualitativamente evaluados, han logrado inducir su síntesis.

**316. Infección por MMTV en ratones deficientes en integrina  $\beta$ 7.** Paula Berguer, P Bekinschtein, Isabel Piazzon, Susan Ross.

ILEX-CONICET, Instituto de Investigaciones Hemato-lógicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires; Department of Microbiology/Cancer Center, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA.

El virus del tumor mamario murino (MMTV) se transmite a través del amamantamiento. Se ha postulado que los linfocitos de las placas de Peyer (PP) serían su primer blanco. Se sabe que la mayoría de estos linfocitos expresan la integrina  $\beta$ 7 que media la adhesión a las vénulas de endotelio alto (HEV) de las PP y su retención en las mismas. Para investigar el rol de dichos linfocitos en la infección por el MMTV, ratones *knock-out* (KO) para integrina  $\beta$ 7 y hermanos controles que expresan dicha molécula, fueron infectados con MMTV C3H a través del amamantamiento. A los 6 meses se analizó la frecuencia de los clones T V $\beta$ 14+ reactivos al superantígeno en sangre periférica mediante técnicas citofluorométricas. Los resultados se expresan como el promedio del porcentaje de células T V $\beta$ 14+ CD4+  $\pm$  DS (n): 1)  $\beta$ 7 controles: 2.57 $\pm$ 0.82(4); 2)  $\beta$ 7 KO: 1.76 $\pm$ 0.65 (5); N.S. Se estudió la integración del virus en timo, ganglios, PP y bazo mediante PCR semicuantitativo y posterior hibridación utilizando primers y sonda específicos para el LTR viral y se observó la presencia de provirus tanto en los ratones  $\beta$ 7 KO como en los controles. No se encontró disminuida la integración viral en los ratones KO. El conjunto de estos resultados sugiere que la ausencia de linfocitos que expresan integrina  $\beta$ 7 no impide la infección de los ratones por el MMTV C3H.

**317. Evaluación de la funcionalidad de las diferentes clases de RFc $\gamma$  murinos. Efecto del LPS. Modulación por el anti-CD11b/CD18.** C Rubel, GC Fernández, I Mathov, M Isturiz, M Palermo

Inmunología, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, IDEHU-CONICET, UBA

Anteriormente, demostramos que el tratamiento *in vivo* con LPS aumenta la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) mediada por el RFc $\gamma$ . Dicho aumento se ve bloqueado por la preincubación *in vitro* con anti-CD11b/CD18. Considerando que existen 2 tipos de receptores RFc $\gamma$  diferentes (RFc $\gamma$  I que une IgG3 y RFc $\gamma$  II/III que une IgG1) evaluamos si el aumento de la CCDA estaba restringido a algunos de los 2 receptores. Se observó que el LPS produce un aumento de la CCDA mediada por el RFc $\gamma$  II/III sólo a alta concentración de IgG1 (N=31.4 $\pm$ 1.3 LPS=53.8 $\pm$ 1.9 n=15 p<0.0001). En el caso del RFc $\gamma$  I el aumento fue mayor a baja concentración de IgG3 (N=22.1 $\pm$ 1.5 LPS=37 $\pm$ 2.9 n=11 p<0.0001). Posteriormente se analizó si el bloqueado por el anti-CD11b/CD18 inhibe la CCDA mediada por los dos tipos de receptores. Los resultados son: RFc $\gamma$ I (N+ $\alpha$ CD11b/CD18=10.4 $\pm$ 0.4 LPS+ $\alpha$ CD11b/CD18= 7.8 $\pm$ 1.2n=8p<0.0001), RFc $\gamma$ II/III(N+ $\alpha$ CD11b/

CD18=19.8±1.4LPS+αCD11b/CD18 = 19.4±1.1 n=12 p<0.0001). Los resultados muestran que el LPS aumenta la CCDA mediada por ambos tipos de receptores, mientras que el tratamiento *in vitro* con anti-CD11b/CD18 lleva los niveles citotóxicos a valores normales, sugiriendo que el CD11b/CD18 participa ampliando la CCDA tanto por el RFcy I como por el II/III murinos.

### 318. Mecanismos involucrados en la respuesta al superantígeno codificado por los virus MMTV BALB14 y C3H.

Valeria Buggiano, Alejandra Goldman, P Bekinschtein, Paula Berguer, Irene Nepomnachy, Isabel Piazzon.

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

En este trabajo se compara la capacidad estimuladora del superantígeno (SAG) codificado por el MMTV exógeno BALB14 (reactivo a los clones T VB14+) con otro conocido, el C3H, cuyo SAG, débilmente estimulador, posee la misma especificidad. Leche portadora de a) BALB14, b) MMTVC3H o c) libre de virus fue inoculada en la almohadilla plantar y al día 4 se determinó por citofluorometría el N° absoluto de linfocitos 1) T VB14+ (reactivos a ambos SAGs) y 2) B IgG+ en el ganglio poplíteo (gp). En todos los ensayos se evaluó la frecuencia de clones T no relacionados. Los resultados fueron: 1) a) 2.1±0.6(4) vs b) 1.2±0.3(4)\* vs c) 0.2±0.01(4); 2) a) 4.7±1.3(4) vs b) 5±0.8(4) vs c) 1.4±0.4(4) (media±DS(x10<sup>-6</sup>)(n)). Se investigaron los mecanismos involucrados en la actividad estimuladora. El N° absoluto de linfocitos en fase S y G2-M, usando iodo de propidio y acs. monoclonales fue: 1) a) 23±3(4) vs b) 8±0.9(4)\* vs c) 0.4±0.04(4); 2) a) 24±3(4) vs b) 15±3(4) vs c) 1.8±0.8(4) (x10<sup>-4</sup>)(n). Se inocularon por vía iv linfocitos marcados con FITC simultáneamente a la estimulación con los virus. El N° de linfocitos FITC+ en el gp fue: 1) a) 90±6(4) vs b) 40±5(4)\* vs c) 10±2(4); 2) a) 39±3 vs b) 65±7.2 vs c) 17±1.4 (x10<sup>-3</sup>)(n). Esto demuestra que la mayor capacidad estimuladora detectada para el SAG del BALB14 respecto del de C3H correlaciona con una diferencia significativa (\*p<0.05) en la proliferación como en el reclutamiento de los clones T reactivos. Si bien ambos virus inducen un aumento similar en el número de células B IgG+, los mecanismos involucrados son diferentes.

### 319. Marcadores serológicos de respuesta inmune. P Paradiso, O Vargas, L Adan

*División Hemoterapia, Hospital Durand, Buenos Aires*

Una donación de sangre sólo es apta para ser transfundida cuando las pruebas serológicas resultan no reactivas para HBV, HCV, HIV, HTLV, Enfermedad de Chagas, Sífilis y Brucelosis. Sin embargo y dado el período de ventana inmunológica, es posible estar en presencia de un individuo recientemente infectado. **Objetivos:** 1) Cuantificar IL-6, IL-4 e IFNγ. Establecer el rango de cc normal de IL-6 en muestras no reactivas. 3) Detectar PCR (Proteína C Reactiva) y correlacionarla con IL-6. **Materiales y Métodos:** Muestras de suero provenientes de 150 donantes: 70% Hom.-30% Muj.-edad: 26-58 años, se desarrolló serología convencional y se determinó la cc de IL-4, IL-6 e IFNγ. **Resultados:** Donantes reactivos: 17/150 mostraron incremento de alguna de las interleuquinas investigadas, 2/17: IFNγ (HIV, Ac Heterófilos), 2/17 IL-6- (Chagas-HBV), 7/17: IL-4- (HCV-HBV-HIV-Antígenos febriles), 5/17: PCR-, IL-6- sin otra patología, 1/17: PCR-, IL-6- (Salmonelosis). **Donantes no reactivos:** IL-4 e IFNγ no detectables, la cc de IL-6 resultó 7.72±2.29 pg/ml. **Conclusiones:** Las concentraciones de PCR e IL-6 se correlacionan (r=0.97). Proponemos la investigación de PCR, dado su bajo costo y la sencillez de la determinación.

### 320. Enfermedad de Chagas experimental: Modulación de los niveles de IL12 e IL10 por inmunización de ratones con *Trypanosoma rangeli*

B Basso, E Moretti, L Cervetta, C Truyens, Y Carlier

*Servicio Nacional de Chagas, Universidad Nacional de Córdoba; Universidad Libre de Bruselas, Bélgica*

En nuestro laboratorio se ha desarrollado un modelo de inmunización en ratones Balb/c con *Trypanosoma rangeli*, que protege de la infección con *T. cruzi*. El objetivo de este trabajo fue analizar el balance entre IL12 e IL10, citoquinas involucradas en la selección de la respuesta inmune hacia Th1 o Th2, en el suero de ratones normales (N), infectados con 1500 tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Tulahuén (I), e inmunizados con epimastigotes fijados de *T. rangeli* previo a la infección (I-I). Los valores de IL12 en N, fueron de 979±124 pg/ml; en I el día 13pi: fueron 4020±403 pg/ml y los I-I revelaron una concentración de 9478±970 (p<0.003). Por el contrario, IL10 mostró en los N valores de 24.8±15 pg/ml, mientras que en I fueron para el mismo día, 198±99pg/ml (p<0.01) y los I-I niveles similares a los normales (27.7±99pg/ml). Los resultados demuestran que la inmunización con *T. rangeli* induce un aumento significativo de IL12 y por el contrario, reduce la liberación de IL10 a niveles normales. La modulación de este balance entre las citoquinas estudiadas, podría ser uno de los mecanismos involucrados en la resistencia inducida por la inmunización con *T. rangeli* en este modelo experimental.

### 321. Expresión intracelular de citoquinas en sangre de cordón. A Bernasconi, J Rossi, A Somardzic, M Panozzo, A Lopez, M Zelazko

*Hospital de Pediatría, J. P. Garrahan, Buenos Aires*

El uso de sangre de cordón como fuente de precursores hematopoyéticos, con características particulares de reconstitución inmunológica y menor incidencia de enfermedad injerto contra huésped post trasplante, dan importancia al estudio del patrón de citoquinas de sus células inmunocompetentes. Como control se midió en sangre entera de adultos normales, estimulada con PMA/Ionomicina en presencia de Brefeldina A, la cinética de producción de IL2, IL4 e IFNγ durante 24 hs. en células T CD3+CD8- (CD4+) y CD3+CD8+. Se evaluó en 6 muestras de cordón el patrón de citoquinas a las 4 hs de estímulo. La cinética en los adultos mostró a las 4 hs. una mayor proporción de células CD3+CD8-productoras de IL2 y en menor grado, IFNγ e IL4. El pico máximo se vió a las 10 hs. para IL2 (48%) e IFNγ (26%) y a las 12 hs. para IL4 (11%). Las CD3+CD8+ fueron mayoritariamente productoras de IFNγ (30%) y en mucho menor proporción de IL2 (8%), con máximos a las 10 hs. En cordón, el porcentaje de CD3+CD8-productoras de IL2 (media 25,8%) fue comparable a los normales y no se observaron células CD3+ productoras de IFNγ ni IL4. Una proporción de células NK (media 13%) expresaron IFNγ. El patrón de citoquinas en CD3+CD8- de cordón concuerda con el fenotipo naive mayoritario de estas células (datos de nuestro laboratorio), siendo las NK las principales productoras de IFNγ.

### 322. Producción de IL-2, IL-4 y fenotipo linfocitario en cultivos con Medio Condicionado de Placenta Humana (MCPH).

Mirta Koncurat, A Vivas, D Zubeldía, C Greco

*Microscopía Electrónica y Laboratorio de Inmunología, Universidad Nacional de Río Cuarto*

Citoquinas del tipo Th2 modulan la respuesta que posibilita la gestación, varias de las cuales son fabricadas por la placenta. En nuestro laboratorio producimos MCPH que contiene IL-4, por ello el objetivo de este trabajo fue cuantificar IL-2, IL-4 y estudiar el fenotipo linfocitario en cultivos estimulados con MCPH. Se cultivaron sin y con 10% de MCPH linfocitos de 9 mujeres nulíparas y 10 primigestas en 1er. trimestre de gestación. A los 5 días poscultivo se cuantificaron en los sobrenadantes IL-4 e IL-2 por ELISA y se determinó el fenotipo de la población celular respondedora por IFI. En las gestantes, la [IL-4] fue de 12,77 ± 3,89 pg/ml en cultivos con 10% de MCPH y se observó un aumento significativo (p<0,05) del porcentaje de células CD19+ 23,70 ± 9,79; sin modificaciones en los porcentajes de los linfocitos CD8+ y CD4+. En los cultivos de las nulíparas la [IL-4] fue

significativamente mayor ( $p < 0.001$ ) con un aumento significativo de los porcentajes de linfocitos CD19<sup>+</sup>  $17,23 \pm 3,16$  sin modificaciones en las subpoblaciones T. No se detectó IL-2. El aumento de linfocitos CD19<sup>+</sup>, la producción de IL-4 y la ausencia de IL-2 en los cultivos, demostrarían el efecto inmunomodulador del MCPH sobre el balance Th1/Th2.

**323. Niveles séricos de IL4, il10, INF- $\gamma$  y TGF- $\beta$  en pacientes con úlcera gástrica y/o duodenal infectados con *Helicobacter pylori* (*H. pylori*).** D Dlugovitzky, J Rainoldi, M Nogueras, G Fiorenza, M Bravo-Luna, F Rainoldi

*Cátedras de Microbiología, Parasitología Virología, Facultad de Medicina, UNR; Policlínico Dr. Freyre, Rosario*

**Objetivo.** Evaluar citocinas séricas, inmunomoduladoras, en infectados con *H. pylori*, importante agente etiológico en úlcera gástrica y/o duodenal. **Metodología.** 40 pacientes, ambos sexos (18-80 años). Diagnóst. endoscópico. Test de ureasa en tejido antral gástrico; anatomopatol., cultivo en medios p/H. *pylori*. Tests inmunológicos: Niveles séricos, pre y post tratamiento (Tto)(IL4, IL10, INF- $\gamma$ , TGF- $\beta$ ; ELISA, R&D Systems). Terapia combinada: omeprazol, amoxicilina, eritromicina. Control clínico y laborat.: a los 60 días. Estadíst.: Wilcoxon, Mann-Whitney, Spearman. **Resultados.** Citocinas en pacientes *H. pylori* (+), n=25 y (-), n=15, pre y post Tto. *H. pylori* (+): difer. signif. entre citocinas pre y post Tto (mediana e IC, pre y post: IL4 124 (92-195) y 101 (73-128); IL10 21(16-26) y 14 (11-17); INF- $\gamma$  70 (42-80) y 115 (86-141); TGF- $\beta$  84 (82-91) y 78 (62-81)  $p < .01$ ). *H. pylori*(-): difer. N.S. Citocinas pre-post en *H. pylori* (+) y (-): IL4 U=2,74; IL10 U=3,48; INF- $\gamma$  U=2,07; TGF- $\beta$  U=3,28  $p < .001$ ). Citocinas vs terapia exitosa: ( $r_s = 0,52$ ;  $p < .04$ ). **Conclusiones.** 1) Confirmación etiológica de *H. pylori*. 2) Valores de citocinas alterados en pac. *H. pylori* (+). 3) Difer. signif. en niveles de citocinas entre *H. pylori* (+) y (-). 4) Citocinas en infectados con *H. pylori* sugerirían predominio de TH1.5) Confirmación clínico-inmunológ. del Tto.

**324. IL-12, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  (CKs tipo 1) amplifican la citotoxicidad T inducida por hsp65 (Cx) generando citotoxicidad NK-like.** S de la Barrera, M Alemán, S Fink, M Finiasz, L Rutitzky, MH Fariña, G Pizzariello, MC Sasiain

*Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina; Hospital Muñiz, Buenos Aires*

La presencia de IL-12, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  en las primeras horas de cultivo aumenta la Cx T en pacientes con lepra paucibacilar (PB, n=4) multibacilar (MB, n=8) y normales (N, n=8). Se valoró si las células NK y T  $\gamma\delta$  regularían la Cx T por producir CKs tipo 1. Células efectoras (E): mononucleares totales (CM) o deplecionadas de NK (DNK) o T  $\gamma\delta$  (D $\gamma\delta$ ) cultivadas con hsp65 y TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IL-12 (7 días). Células blanco (B): <sup>51</sup>Cr-[macrófagos autólogos pulsados con hsp65 o células K562]. E y B se enfrentaron 4 hrs (E:B= 40:1) determinándose el % de Cx. Se observó un aumento de actividad NK (K562) en los tres grupos. La Cx T se redujo un 50% en ausencia de NK y T  $\gamma\delta$  [N: Cx-CM= 42 $\pm$ 3, Cx-D $\gamma\delta$  o Cx-DNK=22 $\pm$ 3  $p < 0.05$ , PB: Cx-CM = 60 $\pm$ 6, Cx-D $\gamma\delta$  = 33 $\pm$ 3  $p < 0.05$ , Cx-DNK=39 $\pm$ 4  $p < 0.05$ ; MB: Cx-CM=23 $\pm$ 4, Cx-D $\gamma\delta$  o DNK= 10 $\pm$ 1  $p < 0.05$ ]. Bloqueando E con anti-CD56 en etapa efectora se observó inducción de actividad NK-like en PB y N frente macrófagos. Las CKs tipo 1 ampliarían la Cx T en las etapas tempranas de activación T a través de células NK y T $\gamma\delta$  en MB, PB y N y/o generando actividad NK-like en PB y N.

**325. Niveles circulantes de IL-4, IL-10 y anticuerpos anti-hsp de 60 y 70 kD en pacientes con tuberculosis pulmonar que reciben inmunoterapia con *Mycobacterium vaccae*.** D Dlugovitzky, L Rateni, C Largacha, M Farroni, O Bottasso

*Cátedra de Microbiología e Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas UNR; Servicio de Tisiopneumología Policlínico Carrasco*

Dado que la inmunoterapia con *M. vaccae* mejora los síntomas de la tuberculosis y provoca un descenso en los niveles de factor de necrosis tumoral alfa, también quisimos analizar los valores séricos de IL-4, IL-10, y anticuerpos hacia hsp de 60 y 70 kD de *M. bovis*. Se estudiaron dos grupos de pacientes sin diferencias en edad, sexo, grado de afectación pulmonar y tratamiento antibacilar, que al comienzo del mismo (día 0) recibieron aleatoriamente *M. vaccae* inactivado 10<sup>8</sup> bacilos (n=13), o solución fisiológica (n=10), vía id. Los resultados de los ELISA fueron (media  $\pm$  es), día 0: *M. vaccae*, IL-4 685 $\pm$ 77 (pg/ml), IL-10 3800 $\pm$ 302, anti-70 kD 0.59 $\pm$ 0.05 (DO) anti-60 kD 0.30 $\pm$ 0.03; *Placebo* IL-4 586 $\pm$ 63, IL-10 3863 $\pm$ 270, anti-70 kD 0.62 $\pm$ 0.06, anti-60kD 0.23 $\pm$ 0.04; *Controles* (n=12) IL-4 69 $\pm$ 9, IL-10 35 $\pm$ 6, anti-70 kD 0.25 $\pm$ 0.02, anti-60kD 0.20 $\pm$ 0.02. **Día 30:** *M. vaccae*, IL-4 342 $\pm$ 36, IL-10 2292 $\pm$ 187, anti-70 kD 0.31 $\pm$ 0.03, anti-60kD 0.19 $\pm$ 0.02; *Placebo* IL-4 495 $\pm$ 58, IL-10 3663 $\pm$ 286, anti-70 kD 0.53 $\pm$ 0.06, anti-60kD 0.20 $\pm$ 0.04. La administración de *M. vaccae* promueve un descenso más significativo en los niveles de IL-4, IL-10 y anticuerpos anti-hsp de 70kD.

**326. Determinación de la frecuencia poblacional de delta-CCR5.** Larisa Cybulski, Ernesto Ilriovich, Patricia Motta, Alicia Sorrentino

*Histocompatibilidad Inmunogenética. Servicios de Inmunología e Infectología, Hospital J.C. Ferrando, Buenos Aires*

**Introducción:** CCR5 es un receptor de beta-quimoquinas y actúa como co-receptor para la entrada de cepas de HIV que tienen tropismo por macrófagos, Individuos que no se infectan con HIV tienen una delección de 32 nucleótidos en el gen de CCR5. La presencia de este gen mutado en estado homocigota, protege de la infección por HIV. En su estado heterocigota disminuiría la entrada y replicación en linfocitos T CD4. **Objetivos:** Determinar la frecuencia de este alelo mutado en nuestra población normal y una población HIV+. Relacionarlo con las frecuencias observadas en otras poblaciones. **Métodos:** Se estudiaron 73 individuos normales y 20 pacientes HIV+. Se extrajeron muestras de sangre y se separó el ADN por Salting out. Se determinó la presencia del alelo deletado a través de una PCR que amplifica un segmento que flanquea la zona deletada. Se analizó el producto de PCR en geles de agarosa: 189 pb /157bp **Resultados:** La frecuencia del alelo mutado fue 2.7 % (2/73) para su forma homocigota y 20,5 % (15/73) para su forma heterocigota en población normal. En HIV+ solo se encontró la forma heterocigota en 1/20 (5%) **Conclusiones:** La presencia de la forma heterocigota y homocigota del alelo mutado en normales fue similar a la observada en otras poblaciones, en la población HIV+ no se observó la presencia de la forma homocigota.

**327. Diagnóstico de neurobrucelosis por detección de anticuerpos anti-proteínas de Brucella en LCR.** PC Baldi, JC Wallach, Graciela C Racaro, CA Fossati

*IDEHU, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; Hospital F. J. Muñiz, Buenos Aires*

En 1996 se registró el primer caso de neurobrucelosis (NB) detectado en el Hospital Muñiz en los últimos 10 años, confirmado por aislamiento de *B. suis* en líquido cefalorraquídeo (LCR). El diagnóstico inmunológico de la NB se basa en la detección de anticuerpos anti-lipopolisacárido (LPS) en LCR, pero no se ha ensayado la detección de anticuerpos contra proteínas citosólicas de la bacteria. El LCR y el suero del caso de NB, y de 2 pacientes con brucelosis y síntomas centrales (cefaleas intensas) pero sin NB, fueron ensayados por ELISA frente a 2 antígenos de *Brucella*: LPS y un extracto de proteínas citosólicas libre de LPS (CP). Se ensayaron además 10 LCRs de pacientes sin infecciones neurológicas (casos de Alzheimer) y 10 LCRs de pacientes con otras meningitis bacterianas (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *M. tuberculosis*). En el LCR del paciente con NB se detectó IgG anti-CP (1:800) y anti-LPS (1:3200). En suero, se detectó tanto IgM (1:400 y 1: 100, respectivamente) como IgG

(1:6400 y 1:3200). En el suero de los 2 pacientes con brucelosis sin NB se detectaron anticuerpos anti-LPS y anti-CP de ambos isotipos, pero no se detectaron estas reactividades en LCR. El ELISA anti-CP fue negativo frente a LCRs de pacientes con meningitis por otras bacterias. Estos resultados sugieren que la detección de anticuerpos anti-CP puede resultar útil para diferenciar la NB de la brucelosis no complicada que provoca síntomas en el sistema nervioso central.

- 328. Rol de los polimorfismos del CCR5 y CCR2 en la patogenia de la infección por HIV-1 infantil.** Andrea Mangano, J Kopka, M Batalla, R Bologna\*, L Sen

*Laboratorio de Biología Celular y Retrovirus y \*Servicio de Infectología, Hospital de Pediatría J. P. Garrahan, Buenos Aires*

El CCR5 y CCR2 han sido identificados como coreceptores para la entrada del HIV-1 macrófago-trópico. La presencia de los polimorfismos CCR5-Δ32 y CCR2-64I en los genes CCR5 y CCR2 respectivamente, se asocia con un retraso de 2 a 4 años en la progresión a SIDA en adultos infectados. Nuestro objetivo fue investigar la influencia de estos alelos en la progresión a SIDA infantil. Se estudiaron 299 niños HIV-1 infectados por transmisión vertical. A partir de lisados de CMT, los distintos alelos se identificaron por electroforesis en geles de agarosa, posterior a la amplificación por PCR y PCR-RFLP para el CCR5 y CCR2, respectivamente. Los resultados obtenidos correspondieron a los siguientes genotipos: CCR5/CCR5=274; CCR5/CCR5-Δ32=25; CCR2/CCR2=222; CCR2/CCR2-64I=71; CCR2-64I/CCR2-64I=6. El análisis de las curvas de Kaplan-Meier para tiempo libre de SIDA no mostró diferencias significativas entre los pacientes con los alelos mutados o salvajes para dichos genes (Log-rank Test CCR5 P=0.5944; CCR2 P=0.7385). Sin embargo, del total de pacientes analizados, 17 fallecieron al momento del estudio, de los cuales sólo 1 tenía un alelo mutado, el CCR2-64I, sugiriendo una posible influencia del CCR2-64I y CCR5-Δ32 en la prolongación de la sobrevida de los pacientes infectados con el HIV-1.

- 329. Comparación de la Carga Viral (CV) durante la primoinfección por HIV en niños y su relación con protocolo 076 y estadio clínico.** Marcelo Batalla, A Mangano, J Kopka, R Bologna\*, L Sen

*Laboratorio de Biología Celular y Retrovirus y \*Servicio de Infectología, Hospital de Pediatría J. P. Garrahan, Buenos Aires*

El objetivo fue evaluar la CV en niños HIV+ sin tratamiento durante el año y medio de vida; compararlos con los estadios clínicos y con los que recibieron o no profilaxis con AZT. Se realizaron 56 determinaciones de CV de 48 niños HIV+, divididos en 5 grupos etarios: I: 0-3m (n:4), II: 3-6m (n:20), III: 6-9m (n:15), IV: 9-12m (n:10) y V: >12m (n:7). De ellos, 24 (Gx) no realizaron protocolo 076 y 12 (Gy) lo recibieron. De acuerdo al estadio clínico (CDC1994) se los clasificó en A (n:11), B(n:18) y C (n:19). La CV se realizó por RT-PCR Roche o NASBA Organon. **Resultados:** las medianas de las CV ( $\times 10^6$  copias/ml) fueron: I: 1.57, II: 1.16, III: 0.74, IV: 1.08 y V: 0.43. Para los Gx: 1.42 y Gy: 0.59. Según el estadio clínico para los A: 0.46, B: 1.22 y C: 1.40. **Conclusión:** 1- el pico mayor de la CV se registró en el primer trimestre de vida, con un descenso paulatino más acentuado después del año; 2- aunque la CV en niños menores de 9 meses que recibieron 076 fue menor que los que no lo recibieron, no fue estadísticamente significativa, 3- la CV en niños asintomáticos A, fue significativamente más baja que los sintomáticos B y C ( $p < 0.05$ ).

- 330. Distribución del polimorfismo del SDF-1 y su incidencia en la transmisión vertical del HIV-1.** Julieta Kopka, M Batalla, A Mangano, L Sen

*Laboratorio de Biología Celular y Retrovirus, Hospital de Pediatría J. P. Garrahan, Buenos Aires*

El factor derivado del estroma, SDF-1, es una quimioquina que es el ligando natural del coreceptor para las cepas de HIV-1 T-tropicas, el CXCR-4. Recientemente, se describió una mutación que es una sustitución de G por A en la región 3'UTR del transcrito  $\beta$  del SDF-1 (SDF-1 3'A). Nuestro objetivo fue investigar la presencia de esta mutación en una población pediátrica expuesta al HIV-1 (239 infectados y 140 no infectados), y su posible rol en la transmisión vertical de la infección por HIV-1. A partir de lisados de CMT se amplificó por PCR un fragmento de la región 3'UTR del SDF-1  $\beta$  y luego se digirió con MspI. Los fragmentos se identificaron en geles de agarosa. Los genotipos observados fueron: 66.9% SDF-1 +/+, 29.7% SDF-1 +/3'A y 3.3% SDF-1 3'A/3'A en infectados; y 65.7% SDF-1 +/+, 27.9% SDF-1 +/3'A y 6.4% SDF-1 3'A/3'A en no infectados. Las poblaciones se encuentran en equilibrio según Hardy-Weinberg. Nuestros resultados demuestran la presencia de esta mutación en la población estudiada. Si bien no se observaron diferencias significativas ( $p=0.369$ ) entre la población infectada y no infectada, existe una tendencia a un mayor porcentaje de homocigotas mutadas en la población no infectada. En conclusión esta mutación no afectaría la transmisión vertical por el HIV-1.

- 331. Las células NK y T  $\gamma\delta$  modulan la citotoxicidad T a la proteína hsp65 del M.leprae (Cx).** M Alemán, S de la Barrera, M Finiasz, S Fink, L Rutitzky, MH Fariña, G Pizzariello, MC Sasiain

*Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Hospital Muñiz; Buenos Aires*

El objetivo de este trabajo fue determinar si las células NK y T  $\gamma\delta$ , productoras tempranas de IFN $\gamma$ , modulan la Cx en pacientes con lepra e individuos normales (N). Células efectoras (E): se cultivaron células mononucleares totales (CM) o deplecionadas de NK (DNK) o T  $\gamma\delta$  (D $\gamma\delta$ ) con hsp65 (7 días). Células blanco (B): macrófagos autólogos pulsados con hsp65 o células K562, marcados con 51-Cr. E y B se enfrentaron 4 hrs (E:B=40:1) y se determinó el % de Cx. Se observó en MB, una disminución de la respuesta citotóxica NK en CM frescas y cultivadas con aumento de la expresión de células CD56+ /CD16+ en CM frescas y valores de T $\gamma\delta$  similares a PB y N. La depleción de NK o T $\gamma\delta$  produjo una inhibición de Cx T en N (n=7) (Cx-CM=22 $\pm$ 1, Cx-D $\gamma\delta$ =12 $\pm$ 2  $p < 0.05$ , Cx-DNK=10 $\pm$ 1  $p < 0.05$ ) y en los pacientes paucibacilares (PB) (n=4): (Cx-CM=22 $\pm$ 1, Cx-D $\gamma\delta$ = 15 $\pm$ 3,  $p < 0.01$ , Cx-DNK=15 $\pm$ 3,  $p < 0.01$ ). En los pacientes multibacilares (MB, n=10) no se observó modulación de respuesta citotóxica (Cx-CM=10 $\pm$ 1, Cx-D $\gamma\delta$ =10 $\pm$ 2, Cx-DNK=9 $\pm$ 2). Los resultados sugieren que la presencia de NK y T $\gamma\delta$  regularía la actividad T citotóxica por producir citoquinas tipo 1 tempranamente.

- 332. Sensibilidad *in vitro* a Aciclovir de aislados clínicos de Varicela o Herpes Simplex I. Síntesis de Igs y sCD23 AM** Maldonado, FS Ceriatti, VA Toranzo, LI Sabini

*Departamento de Microbiología e Inmunología, UNRC, Río Cuarto*

En estudio previo se comprobó que niños inmunocompetentes alérgicos con Varicela (VZV) o Herpes Simplex I (HVS) tratados con Aciclovir mostraron menor diseminación de lesiones y mayor expresión de moléculas CD2. Los objetivos de esta instancia fueron determinar *in vitro* la sensibilidad de aislados clínicos al antiviral y evaluar *in vivo* los niveles de Igs y sCD23. Se investigaron 4 aislados clínicos VZV y 6 HVS. Aislamiento y stock viral se realizaron en monocapas de células Vero. Se utilizaron 100 DICC50 con concentraciones variables del antiviral. Se evaluó el efecto citopático (ECP) por MO. Se estudiaron 26 alérgicos de 2-8 años, 13 con VZV y 13 con HVS. Se trataron 5d con Aciclovir 40mg/kg/d 6 de cada grupo y los demás con Placebo. Al inicio y 35d se determinaron niveles de IgG, IgA e IgM por IDR e IgE y sCD23 por EIA. EL ECP de VZV y HVS fue inhibido totalmente por 0.75 y 1.25 $\mu$ g/ml del antiviral. Correlacionaron IgE y sCD23,  $r=0.73$ . Los niveles iniciales de IgG, IgM e IgA fueron menores

en HVS que VZV,  $p < 0.02$ . IgG se elevó en HVS con Aciclovir  $p < 0.02$ . Aciclovir *in vitro* inhibió el ECP a bajas dosis. *In vivo* regularía la síntesis de IgG y sería más eficaz en HVS.

- 333. Los linfocitos B de ratones infectados con *T. cruzi* presentan una gran activación celular y el estímulo con LPS modifica su ciclo celular y la producción de IL-2.** E Zúñiga, C Motrán, C Montes y A Gruppi.

*Inmunología, Facultad Ciencias Químicas, UNC, Córdoba*

El objetivo del presente trabajo fue investigar sobre linfocitos B (LiB) de ratones infectados con *T. cruzi* los eventos inmunobiológicos que permitan explicar su hiporespuesta a LPS. Ratones normales fueron utilizados como controles. Observamos que LiB de animales infectados presentan apoptosis *in vivo* e *in vitro* (36 hs de cultivo) a juzgar por el mayor % de Li B220+ con DNA subdiploide (64% vs 31% de ratones normales). En los ratones infectados la población B220<sup>low</sup> tiene mayor % de blastos que la población B220<sup>high</sup> (30,3% y 18,1% respectivamente); y estos animales presentan un 28% de células B220<sup>low</sup> vs un 14,5% en los ratones normales. Los ratones infectados tienen mayor % de células B220+Fas+ (39 vs 11% en los controles) y una mayor densidad de expresión de Fas en las B220+ (30,2 vs 18,1 en controles). Los LiB de ratones infectados son capaces de proliferar y secretar IgM e IL-2 espontáneamente y el estímulo con LPS disminuye su blastogénesis espontánea, producción de IL-2 y el % de LiB 220+ que se encuentran en la fase S/G2/M del ciclo celular de 26,6% a 9,8%. Los resultados indican que LiB activados por la infección *T. cruzi* son conducidos a un fenotipo celular con mayor expresión de Fas y el estímulo con LPS produce un arresto de los LiB en G0/G1 y/o a una delección de los que están en S/G2/M.

## NEUROENDOCRINOLOGIA

- 334. Inhibición de la descarga preovulatoria de LH por antagonistas NMDA, en zona incerta medial (ZIm).** C Bregonzio, A Carrión, R Cabrera

*LINCE- CONICET, Mendoza*

Los aminoácidos excitatorios son un componente esencial en la neurotransmisión que participa en la regulación de la secreción de LH y PRL desde la hipófisis anterior. El sistema dopaminérgico incerto-hipotalámico (ZIm) estimula la liberación preovulatoria de estas hormonas. El propósito del presente trabajo fue evaluar la posible participación del sistema glutamatérgico/NMDA en el control ejercido por el sistema dopaminérgico incerto-hipotalámico sobre la descarga de LH en diferentes condiciones hormonales. Se trabajó con ratas hembras en proestro (P) y ovariectomizadas (ovx) impregnadas con estrógeno (E) 25  $\mu$ g 1 ó 2 dosis (E1 y E2 respectivamente) y progesterona (P) 1 mg/rata (9 hs). Los animales fueron implantados bilateralmente en ZIm (- 1 semana) y el día del experimento se les colocó una cánula en la vena yugular; a las 15 hs se administró salina o AP-7 (100 nmoles, antagonista NMDA), o dopamina (DA) (2  $\mu$ g) o AP-7 + DA. Se tomaron muestras de sangre cada hora durante 5 horas. El AP-7 inhibió la descarga de LH proestro  $624 \pm 200$  vs  $5.5 \pm 2.5$   $p < 0.001$ , ovxE1  $1493 \pm 673$  vs  $131 \pm 52$   $p < 0.05$  y revertido por DA  $1490 \pm 505$ . En ovxE2, AP-7 no tuvo efecto pero DA estimuló la liberación de LH  $240 \pm 63$  vs  $132 \pm 32$ . Concluimos que en ZIm el sistema glutamatérgico/NMDA interactuaría con el dopaminérgico en el control de la descarga de LH.

- 335. Inhibición de la liberación de LH por allopregnanolona: participación del sitio GABA<sub>A</sub>.** C Bregonzio, A Carrión, C Fader, R Cabrera

*LINCE-CONICET, Mendoza*

En el sistema nervioso central se sintetizan moléculas esteroideas, las cuales por su origen son llamadas "neuroesteroides".

Una de las más conocidas, moduladora del sistema gabaérgico es la allopregnanolona (ALL). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la acción de este neuroesteroide sobre la descarga de LH en ratas hembra ovariectomizadas (ovx) tratadas con estrógeno (25  $\mu$ g) s.c. y progesterona (1mg/rata) a las 9 hs. El día del experimento, se les colocó una cánula en la vena yugular para la extracción seriada de sangre. A las 15 hs se les administró ALL 50 y 100 nM. i.c.v o su vehículo. Se colectó sangre cada 1 hora desde las 16 hasta las 19 hs inclusive. En otro grupo de animales se administró el antagonista GABA<sub>A</sub>, Bicuculina (Bic) 25 ng/0.5 ml seguido de ALL 100 nM. Los resultados mostraron que ALL 100 nM produjo una caída en los niveles de LH  $3.5 \pm 1.4$  vs  $1.2 \pm 0.3$  18 hs y  $4.1 \pm 1.3$  vs  $1.6 \pm 0.3$  a las 19 hs ( $p < 0.05$ , ANOVA 1 seguido de Student Newman Keuls), mientras que la dosis de 50 nM no tuvo efecto. Bic revirtió la inhibición inducida por ALL  $3.04 \pm 0.5$  vs  $1.2 \pm 0.2$  18 hs y  $3.4 \pm 0.3$  vs  $1.5 \pm 0.3$  a las 19 hs y per se no modificó los niveles de LH. Concluimos que los mecanismos regulatorios gabaérgicos, de la liberación de LH, podrían ser también modulados por los neuroesteroides, como la ALL a nivel hipotalámico sobre el sitio GABA<sub>A</sub>.

- 336. Participación del óxido nítrico (NO) en el efecto de TNF- $\alpha$  sobre la liberación de prolactina.** S Theas, A De Laurentiis, M Pampillo, M Lasaga, B Duvilanski, A Seilicovich

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

TNF- $\alpha$  es un mediador importante de la respuesta hormonal durante procesos infecciosos e inflamatorios. Dado que TNF- $\alpha$  y LPS aumentan la actividad de la NO sintasa (NOS) en diversos tipos celulares, estudiamos la participación del NO en el efecto inhibitorio de TNF- $\alpha$  y LPS sobre la liberación de prolactina desde células adenohipofisarias. TNF- $\alpha$  (50ng/ml) aumentó la actividad de NOS (determinada por conversión de L-arginina-<sup>14</sup>C a L-citrulina-<sup>14</sup>C) desde las 8h de incubación (C:  $1178.17 \pm 57.57$  dpm/well, TNF- $\alpha$ :  $1360.20 \pm 53.69$ ,  $p < 0.05$ ) y hasta las 48h (C:  $1575.82 \pm 60.12$ , TNF- $\alpha$ :  $1993.98 \pm 63.02$ ,  $p < 0.01$ ). LPS (0.1mg/ml) aumentó la actividad de NOS luego de 8 y 48h de incubación (C 48h:  $1440.17 \pm 69.28$ , LPS 48h:  $1912.67 \pm 79.37$ ,  $p < 0.01$ ). La inhibición de NOS por NAME (1mM) revirtió el efecto inhibitorio de TNF- $\alpha$  sobre la liberación de prolactina (C:  $906.2 \pm 61.56$  ng/well, TNF- $\alpha$ :  $446.40 \pm 13.78$ , NAME:  $1145.32 \pm 109.64$ , TNF- $\alpha$ +NAME:  $910.04 \pm 21.26$ ,  $p < 0.01$ ). Nuestros resultados indican que TNF- $\alpha$  y LPS estimulan la actividad de NOS en adenohipofisis y que el NO mediaría el efecto inhibitorio de TNF- $\alpha$  sobre la secreción de prolactina.

- 337. Sistemas serotoninérgico, GABAérgico y aminoacidérgico. Su interrelación sobre la liberación de prolactina.** S Carbone, B Szwarcfarb, D Rondina, P Scacchi, O Ponzio, JA Moguilevsky

*Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA*

Los sistemas serotoninérgico, GABAérgico y de aminoácidos excitatorios (EAA) estimulan la liberación de prolactina (PRL) en ratas hembra prepúberes. Se estudió su interrelación en el efecto facilitatorio sobre la secreción de la misma. Los experimentos (n=8-10) fueron hechos "in vivo" por inyección i.p. y la PRL plasmática (ng/ml) se midió por RIA. El antagonista GABAérgico bicuculina (Bi) 1 mg/kg bloqueó el incremento de PRL ( $P < 0.01$ ) por NMDA 30 mg/kg y por kainato (KA) 2.5 mg/kg (C:  $4.32 \pm 0.51$ ; NMDA:  $7.78 \pm 0.37$ ; KA:  $11 \pm 0.5$ ; Bi+NMDA:  $4.28 \pm 0.62$ ; Bi+KA:  $5 \pm 0.38$ ). El tratamiento con MK-801 (MK) 0.1 y 0.3 mg/kg y CNQX 2.5 y 5 mg/kg, antagonistas de receptores NMDA y no-NMDA de EAA respectivamente, disminuyó el nivel de PRL ( $P < 0.01$ ) inducida por 5-hydroxytryptofano (5-HTP) 75 mg/kg (C:  $5 \pm 0.7$ ; 5-HTP:  $114 \pm 8$ ; MK+5-HTP:  $47.6 \pm 7.1$ ; CNQX+5-HTP:  $40 \pm 6$ ). El aumento de PRL producido por 5-HTP y los agonistas GABAérgicos muscimol y baclofen, no fue bloqueado por Bi, MK y CNQX, respectivamente. El sistema GABAérgico mediaría la estimulación de PRL e interactuaría con otros neurotransmisores durante la maduración sexual.

**338. Efecto de dihidrotestosterona (DHT) y un antagonista de GnRH sobre las isoformas de FSH en la rata macho.** Karina S Zitta, Susana B Rulli, Stella Campo, RSCalandra

*IBYME, CEDIE, Buenos Aires; Facultad de Ciencias. Exactas, UNLP, La Plata*

Hemos descrito previamente que la distribución de isoformas de FSH está modulada por andrógenos. En el presente trabajo se investigó si dicho efecto ocurre a través de la acción de GnRH. Se analizó un modelo *in vivo* con ratas adultas control (C), castradas (Cx), tratadas con DHT (Cx+DHT; 250 µg/rata) en combinación con el antagonista de GnRH Org 30276 (Cx+DHT+Ant; 1 mg/kg/día), o con antagonista (Cx+Ant), durante 8 días. Se determinó el perfil sérico de FSH por RIA, donde se observó un aumento en los niveles de FSH (ng/ml) en Cx+Ant+DHT (10±1) respecto de Cx+Ant (4.8± 0.3; p<0.001), coincidente con C (9.6±1). A partir de citosoles de hipófisis se separaron tres grupos de isoformas por cromatografía en Concanavalina A: NR (estructuras de oligosacáridos trianténarias); DR (bianténarias); FR (alta manosa e híbridos). La proporción relativa de isoformas NR disminuyó en Cx (C:14±1; Cx:4±0.3; p<0.05) y se restableció en Cx+Ant, Cx+Ant+ DHT y Cx+DHT. En DR, Cx (33±2) no presentó diferencias significativas con Cx+Ant y Cx+Ant+DHT, pero sí con Cx+DHT (47±2), que es igual a C. FR aumentó en Cx (62±2) y Cx+Ant (51±4), respecto de C (38±3; p<0.05), y se restableció en Cx+Ant+ DHT (38±4) y Cx+DHT (38±2). En resumen, al bloquear la acción de GnRH, DHT es capaz de aumentar la secreción de FSH y modificar su perfil de isoformas.

**339. Niveles Séricos de Prolactina Luego del Tratamiento Prolongado con el Antagonista D2-5HTA2, Risperidona en Pacientes Esquizofrénicos Hospitalizados.** NM Zelaschi, S Gaitán, SO Panizzo, AB Sobrero, AE López, JL Rodríguez, FM Archuby

*Hospital Neuropsiquiátrico A. Korn, Facultad de Medicina, UNLP, La Plata.*

Los Antipsicóticos Típicos (APT) son antagonistas dopaminérgicos D<sub>2</sub> que aumentan los niveles de prolactina (PRL) durante el tratamiento prolongado o con dosis mínimas. El objetivo fue analizar el efecto hiperprolactinérmico del nuevo antipsicótico antagonista D2-5 HTA2, Risperidona (Ris) en un grupo de 11 pacientes varones esquizofrénicos internados (Criterio DSM IV). La PRL se determinó por enzimoimmunoensayo en ayunas a las 8 AM, cada 6 semanas (Período I al VIII -8 determinaciones por paciente) y se comparó con voluntarios del mismo sexo (GC). La dosis permaneció constante durante el mes previo a cada dosaje y el período de seguimiento se extendió por 12 meses. Se utilizó el análisis no paramétrico de las varianzas para determinar las variaciones en las dosis y niveles de PRL durante sucesivas mediciones. (Test de ANOVA por Rangos de Kruskal - Wallis y el test de Mann Whitney. Los datos (x ± ds) mostraron un aumento significativo de la dosis (mg/día) a través de los períodos I-VIII: I = 2.18 ±0.4, VIII= 3.5 ±0.82, H=31.55, p=0000. Los niveles de PRL del GC fueron 17.33 ± 4.44. Los niveles de PRL (ng/ml) aumentaron significativamente con relación al GC: período I 33.92 ± 19.16, p=.0042, H=19.12 p=.0142; II: 34.50 ± 2.36, p=.0001) VII 34.04 ±3.67, p=.0076, VIII 32.07 ± 3.50, p=.042. Se sugiere que la Ris podría tener algunas de las propiedades farmacológicas de los antipsicóticos clásicos y que sus efectos neuroendócrinos podrían persistir durante tratamientos prolongados.

**340. Interrelación de NO, GABA y Aminocidos excitatorios (AAE) en la liberación de LH-RH en ratas hembra adultas.** B Szwarcfarb, S Carbone, D Rondina, V Rettori, O Ponzio, P Scacchi, JA Moguilevsky

*Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA*

El NO, el GABA y los AAE modulan la liberación de LH-RH. Se estudió en fragmentos de hipófisis medio basal (n=10) de ratas hembra adultas castradas y estrogenizadas la liberación *in vitro*

de LH-RH (pg/ml) producida por : A) Nitroprusiato (NP) (5x10<sup>-4</sup> M), liberador espontáneo de NO, en presencia de bicuculina (B) (1x10<sup>-4</sup> M) y MK-801 (MK) (1x10<sup>-4</sup> M), antagonista GABA-A y de receptores NMDA de AAE, respectivamente; B) N-methyl-L-arginina (NMMA) (5x10<sup>-4</sup> M), inhibidor de la sintetasa del NO, en presencia de N-methyl-D-aspartato (NMDA) (5x10<sup>-4</sup> M) y GABA (1x10<sup>-4</sup> M). Se observó que la inhibición por NP (p<0.01) fue antagonizada por B y por MK (C: 1.72±0.25; NP: 0.6±0.04; B: 1.65±0.10; MK: 1.57±0.18; B+NP:3.6±0.85; MK+NP:1.6±0.21). El NMMA no antagonizó la acción inhibitoria del GABA ni el estímulo por NMDA (C:1.65±0.10; NMMA: 11.58±0.06; GABA: 0.45±0.07; NMDA: 3.7±0.6; NMMA+GABA: 0.64±0.17; NMMA+NMDA:4.36±0.32) (p<0.01). Se concluye que existiría una interrelación entre los sistemas estudiados, sobre la liberación de LH-RH.

**341. Met-enkefalina: regulación por glucocorticoides.** Gloria Levin, M de Lourdes Figuerola, M del Carmen Negueruela, Marta Barontini

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

Se ha descrito una acción estimuladora de la producción de met-enkefalina (ME) por acción de glucocorticoides *in vitro*. Con el objeto de estudiar el comportamiento de la ME plasmática *in vivo* analizamos pacientes con síndrome (SC, n=6) y enfermedad (EC, n=7) de Cushing, hiperplasia suprarrenal congénita (n=3) (HSC), Addison (n=3) (A) y respectivos controles (C), antes y después del test de supresión por Dx (SC, EC, HSC y C) y estimulación por ACTH (A y C). La ME se determinó por RIA con antiseros específicos. Los resultados se expresan en pmol/ml. La ME basal fue similar en controles y pacientes excepto en la HSC que tuvo valores no detectables. Post-Dx el incremento de ME fue significativo (p<0.01): C: 0.52±0.1, SC: 0.49±0.07, EC: 0.53±0.07. A los 30' post-ACTH aumentó en C (0.58±0.19; p<0.05) y en dos A, disminuyendo a los 60'. Los pacientes con HSC post-Dx alcanzaron valores controles (0.28±0.01). En conclusión estos resultados muestran un incremento de los niveles de ME plasmática luego de la administración de corticoides o de la inducción de su aumento, dando nueva evidencia de la influencia de los glucocorticoides sobre los péptidos opioides endógenos.

**342. Efecto endocrino de un agonista GABA C, el ácido cis-4-aminocrotónico (CROT), en células adenohipofisarias.** E Rey-Roldán, V Lux-Lantos, A Champson-Reig, C Libertun

*Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires*

Se describieron tres tipos de receptores gabaérgicos: A, B y C. Previamente hallamos efectos endocrinos para los A y B. Aquí investigamos las posibles acciones hormonales de los C. Estudiamos la acción del CROT sobre la secreción de PRL y LH en cultivos primarios de células adenohipofisarias de ratas hembras en tres modelos experimentales. Observamos: 1) Adultas en proestro: CROT 10<sup>-7</sup> y 10<sup>-5</sup>M no modificó la secreción basal de PRL (3 hs.de incubación), pero disminuyó la liberación de PRL cuando se la estimula con TRH10<sup>-7</sup> (en %): Control:100±6; TRH:232±24; TRH-CROT10<sup>-5</sup>:159±18 (ANOVA, p<0.05). 2) Cultivos enriquecidos en lactotropos (provenientes de ratas pretratadas con E<sub>2</sub>): CROT no modificó los niveles basales de PRL pero inhibió la liberación de PRL inducida por TRH10<sup>-8</sup>: C:100±10; TRH:162±13; TRH-CROT10<sup>-7</sup>:118±16 (p<0.05). 3) En células de ratas de 15 días, muy sensibles al GnRH, CROT (10<sup>-9</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-5</sup>M) disminuyó la secreción de LH inducida por GnRH 10<sup>-9</sup>M: C:100±17, GnRH:346±35; GnRH-CROT10<sup>-9</sup>:278±32; GnRH-CROT10<sup>-7</sup>:255±45; GnRH-CROT10<sup>-5</sup>: 254±29 (p<0.05), sin modificar la secreción basal. Los resultados obtenidos muestran que el CROT, no modifica la secreción basal de PRL ni LH en células adenohipofisarias cultivadas "in vitro" en los tres modelos, pero el agonista GABA C inhibe la liberación de PRL inducida por TRH en ratas hembras en proestro o estrogenizadas y la secreción de LH aumentada por GnRH en animales de 15 días de edad. Por primera vez se describe un efecto endocrino de los receptores GABA C a nivel hipofisario. (CONICET-UBA)

- 343. Regulación por NGFβ de la funcionalidad de feocromocitomas humanos en cultivo.** Eliana Pellizzari<sup>1</sup>, Inés Armandó<sup>1</sup>, María V. Cantó Soler<sup>2</sup>, Angela Suburo<sup>2</sup>, Selva Cigorruga<sup>1</sup>, Marta Barontini<sup>1</sup>.

*CEDIE, Hospital de Niños R. Gutiérrez<sup>1</sup>, Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral<sup>2</sup>, Buenos Aires*

Se evaluó "in vitro" la regulación por el factor de crecimiento neural (NGFβ) sobre el potencial de diferenciación y la secreción de catecolaminas en las etapas iniciales de cultivos de feocromocitomas humanos. Las células disociadas de dos tumores (GM, intraadrenal y CQ, paraganglioma) se cultivaron en DMEM:F12, 10% SFB (basal), y a partir del día 2 bajo estímulo con NGFβ (20ng/ml). Las catecolaminas secretadas, noradrenalina (NA) y adrenalina (A), se determinaron por HPLC-DE. En los cultivos se distinguieron numerosas células redondas no adherentes y células adheridas con y sin prolongaciones de tipo neurítico. Estos dos últimos fenotipos exhibieron inmunoreactividad para los marcadores neuronales: neuropéptido Y, somatostatina, encefalina, cromograninas y óxido nítrico sintasa neuronal. El NGFβ indujo un mayor desarrollo de las prolongaciones neuríticas y cambios en los patrones de inmunomarcación neuronal. Simultáneamente disminuyó los niveles de catecolaminas en los medios de cultivo (NA: 33,7±6,8%; A: 43,0±9,6%, p<0,05, Wilcoxon rank sum test. Valores representativos (nmol/10<sup>6</sup>cél) en medios condicionados entre los días 3 a 5 en cultivo, GM: basal: NA 44,6 - A 6,6; NGFβ: NA 20,4 - A 3,7. CQ: basal: NA 8,4 - A 16,9; NGF: NA 6,9, A 12,6). Estos hallazgos demuestran que el NGFβ regula las características morfológicas y funcionales de las células de feocromocitoma humano, y que el cultivo de estos tumores es un modelo útil para evaluar su regulación funcional.

- 344. La leptina aumenta la secreción de hCG en cultivos de citotrofoblasto humano.** D Chardonens, Paula Cameo, FP Pralong, R Gaillard, A Campana, P Bischof

*Departamento de Obstetricia y Ginecología; Hospital Universitario, Ginebra y División de Endocrinología, Departamento de Medicina, Lausanne, Suiza.*

En el embarazo, la concentración sérica de leptina, se encuentra elevada. Recientemente se mostró que la placenta humana produce leptina, pero no se conoce el rol y su regulación. Usando cultivos puros de células de citotrofoblasto (CTB), medimos la producción de hCG basal, y después del agregado de GnRH, leptina recombinante humana (rhlep), y/o antagonistas de GnRH. Las CTB fueron obtenidas por tripsinización de placentas de primer trimestre, separadas de las células sanguíneas y del sincicio por gradiente de Percoll e inmunopurificadas con anticuerpos (anti CD45) acoplados a partículas magnéticas. Se incubaron por duplicado en presencia o ausencia de GnRH, rhlep (1-100 ng/ml) y/o los antagonistas. Se midió hCG por ELISA. Los resultados se expresaron como porcentaje del control por mg de proteína por día ± SEM. El análisis estadístico se realizó por ANOVA. Rhlep estimuló la producción de hCG en forma dosis dependiente (p=0.0039). La incubación con 1µg/ml de rhlep, aumentó la secreción de hCG a 527 ±159% (p<0.006). Antagonistas de GnRH (0.1 µg/ml) inhibieron la estimulación producida por leptina (p=0.0028 y p=0.028). Esta es la primera evidencia de estimulación de la secreción de hCG por leptina en placenta. El GnRH estaría involucrado.

- 345. El epitelio de glándula mamaria normal murina sintetiza un factor que inhibe la acumulación de triglicéridos en preadipocitos 3T3-L1.** Marcela Sandoval, Cynthia Zizola, G Bertolesi, Carla Molinari, María Eugenia Sanchez Ruiz, JC Calvo

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

El sistema murino NmuMG/3T3-L1 (células epiteliales mamarias normales/fibroblastos preadipocitos) permite el estudio de la interacción epitelio mamario/estroma adiposo, utilizando cocultivos (SAIC/97) o medio condicionado obtenido de las líneas. Medio condicionado (MCD) de NmuMG, cultivadas en DMEM-7% SFB, liofilizado, fue adicionado a cultivos de 3T3-L1 en proceso de diferenciación. La acumulación de triglicéridos (TG) en los 3T3-L1 tratados con MCD, respecto de los tratados con iguales concentraciones de medio control (MCT: DMEM-7% SFB, sin contacto con NmuMG), resultó ser 97,3±16,7; 41,4±3,8; 30,5±5,4; 44,5±5,6 y 72,6±3,6 % para concentraciones de 50; 150; 300; 500 y 1000 mg/ml de MCD. Por el contrario, con concentraciones de 1500; 2000 y 2500 µg/ml de MCD, los valores de mg TG/µg ADN superaron a los obtenidos con MCT en un 10,4±2,0; 52,6±16,3 y 148,7±6,9 %. MCD, calentado a 56°C y 70°C durante 30 minutos, mantiene la capacidad inhibitoria, pero la pierde a 100°C. Los resultados indican que las NmuMG sintetizan un factor proteico que estaría implicado en el control de la acumulación de TG en los 3T3-L1 durante el proceso de diferenciación a adipocitos. Se ha iniciado la caracterización química del factor.

## GASTROENTEROLOGIA II

- 346. Efecto de la silimarina (S) sobre el metabolismo de fase II en ratas con colestasis por etinilestradiol (EE).** EJ Sánchez Pozzi, Viviana A Catania, AD Mottino, MG Luquita, FA Crocenzi, MG Roma

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

La colestasis inducida por EE podría asociarse a una alteración del metabolismo de fase II. S es un hepatoprotector potencialmente útil en el tratamiento de esta hepatopatía. Este estudio evalúa si S previene los efectos de EE sobre el metabolismo de fase II. *Métodos:* Se utilizaron 4 grupos experimentales (n=6): uno recibió EE (EE, 5 mg/Kg/día, s.c., 5 días), otro S (S, 100 mg/Kg/día, i.p., 5 días), un tercero EE y S (EE+S) y el cuarto sirvió de control (C). Las actividades enzimáticas hepáticas evaluadas fueron p-nitrofenol glucuronosil-transferasa (pNPGT), bilirrubina glucuronosiltransferasa (BRGT) y glutation S-transferasa (GST). *Resultados* (media±ES): pNPGT (nmol/min (mg prot.)<sup>-1</sup>) no fue afectada por ningún tratamiento (C: 3.1±1.0, EE: 2.0±0.6, EE+S: 2.4±0.8, S: 2.1±0.2; p>0.05). BRGT (nmol/min(mg prot.)<sup>-1</sup>) fue disminuida por EE, y esta disminución fue prevenida por S; S *per se*, en cambio, no afectó la actividad BRGT (C: 0.35±0.07, EE: 0.18±0.06\*, EE+S: 0.31±0.12\*, S: 0.34±0.08\*; \*p<0.001 vs C, \*p<0.05 vs EE). GST (µmol/min(mg prot.)<sup>-1</sup>): EE disminuyó significativamente la actividad enzimática pero este efecto no fue revertido por S, la cual *per se* disminuyó esa actividad (C: 4.3±0.6, EE: 2.9±1.0\*, EE+S: 2.3±0.6\*, S: 2.7±0.5\*; \*p<0.01 vs C). *Conclusiones:* S es capaz de prevenir el efecto de EE sobre la glucuronización de bilirrubina, pero no muestra efecto preventivo sobre la disminución de la conjugación con GST, posiblemente por un efecto inhibitorio propio de la droga sobre este sistema enzimático.

- 347. Efectos de la obstrucción biliar completa de 1 hora sobre el sistema hepático detoxificador de fase I en la rata.** Rut M Agüero, C Favre, María L Alvarez, EA Rodríguez Garay

*IFISE-CONICET, UNR, Rosario*

La obstrucción biliar completa disminuye el contenido hepático de citocromo P-450, atribuyéndose dicho efecto a la calidad y cantidad de ácidos biliares acumulados. A fin de analizar las etapas precoces de colestasis, luego de depletar los ácidos biliares durante 15 horas, se obstruyó el conducto biliar en tres grupos de ratas Wistar; dos de ellos fueron repletados con ácido taurocólico (ATC) y ácido taurooursodesoxicólico (ATUDC) inyec-

tados i.p. y el tercero con el solvente utilizado (DAB). Un cuarto grupo depletado no fue obstruido (DSO). Antes (C) y luego de 1 hora de la obstrucción se efectuó el test de desmetilación de <sup>14</sup>C-aminopirina (ABT). En otra serie de experimentos los hígados fueron extraídos para determinación de actividad nifedipina oxidasa microsomal (NO). Los resultados obtenidos en C, DSO, DAB, ATC y ATUDC fueron: *pico de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> espirado*: 0.30±0.01 (n=16); 0.27±0.02 (n=3); 0.12±0.04 (n=2)\*; 0.17±0.01 (n=3)\*; 0.23±0.01 (n=3) y *1/2 de espiración de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>*: 33.9±1.5; 35.95± 0.86; 75.2±17.4\*; 58.2±3.6\*; 48.41±2.5, \*p<0,05 respecto a C. La actividad NO disminuyó en los grupos obstruidos. Los efectos observados sugieren considerar fenómenos inflamatorios inmediatos a la obstrucción. El menor efecto de ATUDC estaría relacionado con su capacidad hepatoprotectora.

**348. Protección por el hepatoprotector silimarina (S) de la colestasis inducida por etinilestradiol (EE) en la rata.** FA Crocenzi, JM Pellegrino, EJ Sánchez Pozzi, Viviana A Catania, MG Luquita, AD Mottino, MG Roma

*Instituto de Fisiología Experimental, CONICET - UNR*

Se analizó si la colestasis inducida por EE (5 mg/Kg/día, s.c., 5 días) es prevenida por la administración simultánea de S (100 mg/Kg/día, i.p.). EE aumentó la fosfatasa alcalina sérica (FA) y disminuyó el flujo biliar (FB) y la excreción de sales biliares endógenas (ESB) y de bro-mosulfotaleína (EBSF, 60 mg/Kg, bolo i.v.) vs el grupo control (C). La S revirtió total o parcialmente estas alteraciones (FA: C: 260±5, EE: 364±16\*, EE+S: 259±20\* U/l; FB: C: 1.56±0.11; EE: 0.66±0.04\*, EE+S: 1.07±0.05\*\* μl/min(g hig.)<sup>-1</sup>; ESB: C: 33±3; EE: 21±2\*; EE+S: 30±2\* nmol/min(g hig.)<sup>-1</sup>; EBSF: C: 1.20±0.05; EE: 0.46±0.02\*; EE+S: 0.91±0.02\*\* mg/60 min(g hig.)<sup>-1</sup>; \*p<0.05 vs C; \*\*p<0.05 vs EE). La reducción de ESB inducida por EE ocurrió a expensas de las SB colato, quenodesoxicolato y desoxicolato (-69%, -56%; y -63%, respectivamente; p<0.005 vs C), determinadas por HPLC. La S mejoró (p<0.05 vs EE) sus excreciones (+68%, +63% y +93%, respectivamente), así como la de muricolato (+40%) y ursodesoxicolato (+53%). La S previno además parcialmente la disminución del "pool" de SB (medido por derivatización externa crónica de bilis) inducida por EE (C: 290±30, EE: 121±10\*, EE+S: 223±18\*\* μmol/Kg; \*p<0.05 vs C, \*\*p<0.05 vs EE). Se concluye que S protege de la disfunción secretora inducida por EE previniendo la alteración de transportadores y la disminución del "pool" de SB endógeno.

**349. Efecto del hepatoprotector silimarina (S) sobre la excreción de sales biliares (SB) en la rata: Relación con sus propiedades hepatoprotectoras.** FA Crocenzi, JM Pellegrino, EJ Sánchez Pozzi, AD Mottino, MG Roma.

*Instituto de Fisiología Experimental, CONICET - UNR*

Se analizó el efecto de S sobre la secreción biliar, con especial énfasis en la secreción de SB. La S (25, 50, 100 y 150 mg/Kg/día, i.p., 5 días) indujo un aumento dosis-dependiente del flujo biliar (FB) y de la excreción de SB (ESB) comparado con el grupo control, alcanzando un efecto máximo a 100 mg/Kg (FB: de 1.56±0.11 a 1.82±0.08\* μl/min(g hig.)<sup>-1</sup>; ESB: de 33±3 a 50±7\* nmol/min(g hig.)<sup>-1</sup>; \*p<0.05). La determinación por HPLC de la composición de SB reveló que la estimulación de ESB inducida por S se produjo a expensas de un aumento de excreción de la SB muricolato (de 15±2 a 26±4\*) y, en menor medida, de quenodesoxicolato (de 2.3±0.3 a 3.8±0.3\*), urso-desoxicolato (de 1.8±0.3 a 3.1±0.4\*) y desoxicolato (de 1.2±0.2 a 2.5±0.6\* nmol/min(g hig.)<sup>-1</sup>; \*p<0.05). El transporte máximo de SB, determinado infundiendo a velocidades crecientes tauroursodesoxicolato hasta excreción máxima, no fue afectado por S (770±64 vs 784±16 nmol/min(g hig.)<sup>-1</sup>; p>0.05). La S, en cambio, aumentó el "pool" endógeno de SB, medido por derivatización externa crónica de bilis (de 290±30 a 443±50\* μmol/Kg; \*p<0.05). Se concluye que S aumenta la excreción biliar y el "pool" de SB endógenas, estimulando la síntesis de SB de reconocidas propiedades hepatoprotectoras, tales como muricolato y ursodesoxicolato.

**350. Intoxicación aguda por paracetamol: composición lipídica de la membrana microsomal hepática en ratas.** Carolina Ghanem, Cristina Acevedo, J Miño, A Lemberg, Laura Bengochea.

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

Se estableció el efecto de la intoxicación aguda con paracetamol en la composición lipídica de la membrana microsomal hepática. Métodos: Se usaron dos grupos: G1: inyectadas con paracetamol y G2: vehículo. Tras 24 hs se obtuvo la fracción microsomal. Determinamos la cantidad de colesterol, fosfolípidos totales y los identificamos. Se calculó el índice (PC/SM). Estadística ANOVA (Tukey-Kramer, \*p<0.01, \*\*p<0.05). Resultados: (nmol /gr de hígado, X± SEM). Fosfolípidos: Totales: G1=1520±129\*, G2=2481±197; esfingomielina: G1=108±9\*, G2=281±22; fosfatidilcolina: G1=839±72\*, G2=1197±99; fosfatidilserina: G1=92±8\*, G2=342±35, fosfatidilglicerol: G1=157±13\*, G2=96±7; fosfatidiletanol-amina: G1=102±9\*, G2=44±3; fosfatidilinositol: G1= 222±19\*, G2=446±35. Colesterol: G1=360±6\*, G2=440±9; fosfolípido/colesterol: G1=4.22±0.36\*, G2=5.64±0.19; PC/ SM: G1=7.77±0.66\*, G2=4.25± 0.33. Conclusiones: Se detectó una modificación en el perfil lipídico de la membrana microsomal lo que sugiere que el paracetamol interfiere con la ruta biosintética normal de los constituyentes de la membrana microsomal hepática.

**351. Glucuronización de Fármacos y Cambios Ultraestructurales en Ratas Intoxicadas con Paracetamol.** JC Perazzo, Cecilia Ghisolfi, Carolina Ghanem, Camila Scorticati, M Rubio, Laura Bengochea

*Cátedra de Fisiopatología y Farmacología, UBA*

Se evaluó la relación entre los cambios ultraestructurales y la actividad de UDP-GT microsomal hepática en el modelo de intoxicación aguda con paracetamol (APAP). Métodos: se usaron dos grupos: G1: inyectadas ip. con APAP a dosis tóxica y G2: vehículo. Tras 24 hs se obtuvo la fracción microsomal. Se determinó la actividad de UDP-GT microsomal, las enzimas séricas ALT y AST y microscopía electrónica. Estadística AN-OVA (Tukey-Kramer). Resultados: Velocidad de glucuronización: mmol aglicona/min/mg de proteína: morfina: G1: 2.87± 0.54, G2: 3.96±0.38; ác. salicílico: G1: 4.71±0.50, G2: 4.31 ±0.41; paracetamol: G1: 2.74±0.59, G2: 3.8±0.52; cloramfenicol: G1: 4.41±0.58, G2: 5.87±0.55; lorazepam G1: 5.19±0.59, G2: 4.00±0.40; oxacepan: G1: 3.48±0.41, G2: 4.02±0.58; diazepam: G1: 4.20±0.24, G2: 4.08±0.21. No hubo diferencias significativa entre APAP y controles. Se incrementó la AST y ALT (17 y 4 veces respectivamente) del grupo APAP vs. los controles. La microscopía reveló necrosis focal hepatocitaria en las ratas APAP. Conclusiones: El daño hepatocitario indicado por las enzimas séricas y los cambios ultraestructurales no repercutieron en la actividad transferásica enzimática.

**352. Preservación hipotérmica de hígado en solución de la Universidad de Wisconsin (UW) y S-Nitrosoglutation (GSNO). I-Estudios histológicos.** Alejandra Quintana<sup>1</sup>, EEGuibert<sup>2</sup>, A Scandizzi, L Almada, A Martínez<sup>1</sup>, JV.Rodríguez.

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

La función hepática post-trasplante depende de las condiciones de preservación. Se estudió el efecto que produce la adición de GSNO (100, 250 y 500μM) a la UW sobre hígados de ratas Wistar, preservados (48 hs-4°C) y reperfundidos durante 1 hora en un sistema aislado con Krebs-Henseleit/Albúmina-bov. 2%. El daño histológico se determinó en biopsias obtenidas al final de la reperusión. A las 48 hs, en el grupo UW se observó desprendimiento de las células endoteliales, blebs, hepatocitos balonizados y vacuolados alrededor de las venas centrales, con áreas

periportales normales. De los grupos preservados con GSNO, el UW+100µM GSNO mejoró el cuadro histológico con conservación de la arquitectura hepática y vacuolización mínima perivenosa. Concluimos que la dosis 100 µM GSNO preserva la integridad del parénquima hepático ya que reduce la vacuolización y el desprendimiento endotelial, revirtiendo así, en parte el daño por reperfusión.

**353. Preservación hipotérmica de hígado en solución de la Universidad de Wisconsin (UW) y S-Nitrosoglutation (GSNO). II-Respuesta vascular en la reperfusión.** Joaquín V Rodríguez, G Furno<sup>1</sup>, A Scandizzi, L Almada, EE Guibert<sup>2</sup>

*Farmacología, Estadística<sup>1</sup>, Biología Molecular<sup>2</sup>, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR.*

Se estudió el efecto que produce la adición de GSNO (100, 250 y 500µM) a la sol. UW, sobre el lecho portal intrahepático de hígados de ratas Wistar, preservados (48 hs-4°C) y luego reperfundidos en un sistema aislado con sol. Krebs-Henseleit/Albumina bov. 2%. Se determinaron: la resistencia portal intrahepática (R<sub>i</sub>) (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 h, las liberaciones de LDH y K<sup>+</sup> al perfusato y el flujo biliar (FB). En hígados preservados en UW (48 hs-4°C), la R<sub>i</sub> se incrementa significativamente (140 %). La dosis óptima (100 µM GSNO) disminuye la R<sub>i</sub> (controles: 1.37±0.23, n=5, vs. 48hs: 3.30±1.35, n=4, p<0.01; 48hs GSNO-100: 1.54±0.09 n=3) y aumenta el FB (UW 48hs: 0.08±0.03, n=4 vs. GSNO-100: 0.61±0.11, n=3, p<0.05, ml/min/g.hig). Se concluye que la adición de GSNO a UW, mejora en la reperfusión la respuesta del lecho portal y la función de hígados preservados 48

**354. Evaluación funcional de la preservación hipotérmica (PHT) de hepatocitos mediante el cultivo primario.** JA Pazo<sup>1</sup>, JV Rodríguez<sup>2</sup>, F Vega<sup>1</sup>, ME Rodríguez<sup>1</sup>, G Furno<sup>3</sup>

*Fisiología<sup>1</sup>, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, España; Farmacología<sup>2</sup>, Estadística<sup>3</sup>, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas UNR, Rosario*

El objetivo del presente trabajo fue estudiar mediante el cultivo primario, la viabilidad y función de hepatocitos de rata sometidos a PHT en sol. Univ. Wisconsin (4°C) durante 48, 72 y 96 hs. Para ello, se cultivaron en HAM-F12, 10 % suero fetal bovino de 24 a 96 horas hepatocitos controles y previamente preservados (UW48, UW72 y UW96). A los tiempos establecidos se determinaron la fijación a placa (FP)(attachment) expresado por LDH UI/mg prot, aspectos morfológicos y el contenido de glutatión (GSH). Los resultados mostraron que el tiempo máximo de preservación que permite cultivos viables de hasta 96 hs (FP, controles 96: 3.53±0.34, n=6; UW72/96: 3.17±0.61, n=4; UW96/96: 2.07±0.45, n=6, p<0.05, n= n° placas) fue de 72 hs en UW. El GSH mostró un comportamiento correlativo a la FP, los cultivos de UW72/96 desarrollaron monocapas confluentes de células poligonales con citoplasma granular similares a los controles. Puede concluirse que el cultivo primario permite evaluar los efectos de la PHT sobre la viabilidad y función de hepatocitos y utilizarse para estimar los tiempos límites de almacenamiento en hipotermia. Financiado por Xunta de Galicia P-XUGA

**355. Preservación hipotérmica de hepatocitos aislados de rata en solución de la Universidad de Wisconsin (UW). V- Evaluación de soluciones de reoxigenación.** Maricel Klichuk, JV Rodríguez, A Scandizzi, L Almada, M Mamprin, EE Guibert<sup>1</sup>.

*Farmacología, Biología Molecular. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas UNR, Rosario*

Resulta de importancia analizar la respuesta funcional de suspensiones de hepatocitos sometidas a preservación hipotérmica (UW-72hs-4°C-N<sub>2</sub>) mediante estudios de reoxigenación normotérmica (37°C-120 min). El objetivo de este trabajo fue evaluar la

efectividad de dos sol de reoxigenación: Minimum Essential Medium-1 % Alb. Bov. (MEM) y MEM-F adicionada de Fructosa 5 mM, Adenosina 2.5 mM y Glicina 3 mM; como control se utilizó la sol. Krebs Henseleit-Alb.Bov. 1 %. Se analizaron los parámetros: Exclusión de azul tripan (EAT), liberación de LDH, los contenidos de Glutation (GSH), Glucógeno (GN) y la síntesis de Urea (U). Se encontraron diferencias significativas en todas las variables medidas para las células incubadas en MEM-F a los 120 min. EAT (%de cambio): Krebs 74.8±5.9, MEM-F 86.23±7; %LDH: Krebs 18.1±1.7, MEM-F 8.9±2.6; GSH(nmoles/106cel.): Krebs 9.3±0.5, MEM-F 12.2±2; U(nmoles/106cel): Krebs 96.8±1.3, MEM-F 450±43; n=3). Estos resultados sugieren que la composición de la solución MEM-F es adecuada para proteger y mantener la viabilidad funcional de hepatocitos que fueron sometidos a condiciones de preservación hipotérmica.

## FISIOLOGIA PULMONAR

**356. Repetibilidad de la caminata de 6 minutos (6mWT).** Mariana Grinberg, Silvia Quadrelli, C Glize, EM Sobrino, R Rabinovich, AJ Roncoroni

*Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, UBA*

Se ha cuestionado el valor de una única 6mWT por su dependencia de la voluntad del paciente. Para evaluar su repetibilidad se estudiaron 14 pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica :EPOC (edad 62,6± 5,7, VEF1 1.20±0.45 L) a los que se realizaron 2 cuestionarios de evaluación de disnea (CD) y 4 6mWT en 2 días diferentes por 2 distintos observadores. Los resultados de los CD no fueron diferentes (test t) (Fletcher 2.84±1.09 vs 2.66±1.17, magnitud deterioro funcional: 2.07±1.54 vs 2.36±1.22, magnitud de tarea: 1.69±0.72 vs 1.83±0.89, magnitud de esfuerzo: 2±0.87 vs 1.75±0.82, Medical Research Council 1.69±0.99 vs 1.91±1.38, NYHA 2.07±0.61 vs 2.25±0.82, p=NS). Los resultados de los 4 6mWT (ANOVA) tampoco fueron diferentes y sus coeficientes de variación fueron inferiores a 15%: metros caminados CV 3.4±12.9%, Borg final CV 10.2± 22.6%, frecuencia respiratoria final CV 9.7± 6.08 %, CV SaO2 final 2.53± 2.24). Los diferentes CD y el 6mWT realizados por operadores entrenados son altamente reproducibles y los resultados de un único estudio son clínicamente válidos.

**357. Evolución clínica, espirométrica y fuerza de los músculos respiratorios (FMR) en pacientes con Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) tratados con Deflazacort (Df).** A Suarez, L Andrada, A Dubrovsky, LE Mesa, F Pessolano, E Sobrino, AJ Roncoroni, EL De Vito

*Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari; Hospital Francés, Buenos Aires*

**Objetivos:** Comparar la evolución de la Clase Funcional Motora (CFM), Capacidad Vital (CV), fuerza de los músculos respiratorios (FMR) en pacientes con DMD tratados con Df (GDF) respecto de un grupo no tratado (GnDF). **Material y método:** GDF: n=30 (13±4 años), GnDF: n=59 (13±4 años, p NS). Dosis Df: 0.5±0.19 mg/kg, CFM (Vignos PJ, 1963). CVF (% y lts), Pimax, Pemax. Edad que se sentó en silla de ruedas (SR). Altura (cm), si utilizaban SR, se usó la envergadura. **Resultados:** Inicio de tratamiento: 7.8±2.9 años. Tiempo de tratamiento: 5.0±3.5 años (momento de la evaluación)

	GDF	GnDF	P
CFM	4.9 ± 3.1	7.3 ± 2.2	0.001
CVF (Lts)	1.8 ± 0.6	1.3 ± 0.6	0.01
% CVF	82.1 ± 31.3	51.9 ± 25.4	0.001
SSR > 12 Años	57 % (n=14)	100% (n=29)	0.001
Pimax +Pemax (FMR)	131 ± 34.8	117 ± 30.9	NS

**Conclusiones:** GDF mostró un deterioro más lento en la CFM y la CVF y requirieron la utilización de la silla de ruedas en una etapa más tardía de la enfermedad, respecto del GnDF. No hubo diferencia significativa respecto de la FMR.

## NEUROCIENCIAS

- 358. Estructuras límbicas: aportes porcentuales de peso y de superficie cortical al lóbulo límbico en cerebros postmortem de ambos sexos.** A Merlo, E Gómez, T Mascitti, AM Albanese, J Miño, E Albanese

*Facultad de Medicina, Universidad del Salvador, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Medicina, UBA*

El gyrus cinguli anterior (CA), según demostramos, presenta lateralidad derecha. Se determinó si valores % de peso y superficie cortical expuesta y profunda de los componentes del lóbulo límbico (LL), gyrus CA, posterior (CP) y parahipocampalis (PH) presentaban diferencias hemisféricas. Cerebros postmortem, 8 masculinos, 7 femeninos, apareados por edad se procesaron según nuestro método, y los datos por análisis de varianza. Los valores no difieren significativamente entre ambos sexos. La superficie (media±ES) del LL derecho (d) ( $68.46 \pm 1.99 \text{ cm}^2$ ) es mayor ( $p < 0.05$ ) que la del izquierdo (i) ( $61.81 \pm 2.21 \text{ cm}^2$ ). El % de aporte del CA (d) en peso ( $44.40 \pm 1.40$ ) y en superficie ( $49.03 \pm 1.26$ ) al LL (d) es mayor ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ ) que el del CA (i) al LL (i). El % de aporte del CA(d) al LL (d) es mayor ( $p < 0.05$ ) en superficie que en peso. El PH (i) aporta mayor % de superficie ( $29.46 \pm 1.17$ ;  $p < 0.05$ ) al LL (i) que el (d) ( $25.68 \pm 0.82$ ) al LL homolateral. Se concluye: ausencia de diferencias significativas entre valores de ambos sexos, mayor superficie cortical del LL (d) y desigual % de CA y PH en los LL de ambos hemisferios.

- 359. Parámetros conductuales emocionales y cognitivos en ratas sometidas a ventilación forzada con glucocorticoides.** Carlos P Elías, EO Alvarez

*UNINFA y UNIFCO, Cátedras de Farmacología y Física Biológica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza*

El propósito del presente estudio fue evaluar las posibles consecuencias en los mecanismos cerebrales de memoria y emocionalidad de un tratamiento prolongado de corticoides en ratas. Para ellos se usó animales adultos que se sometieron a sesiones de ventilación forzada en una cámara nebulizada en presencia o ausencia de Budesonida ( $115 \mu\text{M}$ ) por 5 min 2 veces al día por 15 días. Al terminar el tratamiento, los controles (Salina,  $n=24$ ) y los experimentales (Budesonida  $n=24$ ) se evaluaron en el Laberinto en Cruz Elevado Asimétrico por exploración y emocionalidad y en una caja de doble compartimiento para aprendizaje de una respuesta de evitación activa. Los resultados mostraron que el tratamiento no afectó significativamente la emocionalidad ( $9.5 \pm 8.4$  vs  $11 \pm 8.7$  cuentas, Salino vs Budesonida en el brazo pared Alta y Baja) o el aprendizaje de la respuesta de evitación ( $62.5 \pm 6\%$  vs  $75 \pm 5\%$  respuestas positivas, Salino vs Budesonida). En conclusión: los datos sugieren que la cantidad de glucocorticoide inhalada no afecta los procesos centrales de la emoción y el aprendizaje.

- 360. Efecto del estrés crónico sobre la actividad corticoadrenal y conductual y receptores  $\beta$ -adrenérgicos cardíacos en ratas con los núcleos anterodorsales talámicos lesionados.** M Suárez, R Fernández, J Enders, N Perassi, A Palma, P Paglini

*Cátedra de Física Biomédica, Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba*

Los núcleos límbicos anterodorsales talámicos (NADT), en ratas, regulan la función corticoadrenal en situaciones basales y de estrés. En este trabajo se estudia la participación del NADT en los niveles de corticosterona plasmática (CP) y adrenal (CA) y sobre la actividad conductual (test de campo abierto) e índice de ansiedad, en ratas sometidas a estrés crónico variable (ECV) y su relación con la afinidad ( $K_d$ ) y la densidad ( $B_{\text{máx}}$ ) de los receptores  $\beta$ -cardíacos. En el 1° día de exposición al test, las ratas con ECV, (sometidas a 5 estresores diferentes, durante 24 días), disminuye la ambulación ( $p < 0.05$ ) y aumenta la defecación ( $p < 0.05$ ) en ratas falsamente lesionadas (control) y disminuye el alzamiento ( $p < 0.05$ ) en las lesionadas. No hay variaciones en la 2° exposición al test en ninguno de los índices evaluados en ratas con ECV. Los niveles de CP aumentan en ratas control y lesionadas con ECV ( $p < 0.01$  y  $p < 0.05$  respectivamente). La CA aumenta en los animales control con ECV ( $p < 0.01$ ) sin modificarse en lesionados. Valorando el índice de ansiedad, en lesionadas con ECV, disminuye el porcentaje de permanencia en los laberintos de paredes altas ( $p < 0.02$ ). La  $K_d$  y la  $B_{\text{máx}}$  se determinó en ventrículos con dihidroalprenolol tritiado y se observó un incremento significativo en la  $B_{\text{máx}}$  y una disminución en la  $K_d$  del grupo estresado con respecto al grupo lesionado con estrés y al grupo basal ( $p < 0.05$ ). Se concluye que el estrés crónico variable y la lesión del NADT afecta los patrones conductuales, los índices de ansiedad, la actividad corticoadrenal y la densidad y afinidad de receptores  $\beta$ -cardíacos. Subsidios: SeCyT-UNCba y CONICOR

- 361. Acción moduladora glutamatérgica del hipocampo ventral sobre el núcleo accumbens en conductas de exploración y emocionalidad en la rata.** Edgardo O Alvarez, AG Orofino

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

El objetivo de este estudio fue investigar la posible influencia de la actividad glutamatérgica del hipocampo sobre el núcleo accumbens en la expresión de la motivación y emocionalidad. Se usaron ratas macho implantadas con cánulas de microinyección en el hipocampo ventral, en el accumbens o en ambas estructuras. Después de microinyectarlas con salina (SAL) o 10 nmol de ácido glutámico (MSG), exploración y emocionalidad se evaluaron en el Laberinto en Cruz Elevado Asimétrico (LCEA) y en un huleboard enriquecido. Los resultados en el LCEA mostraron que el ácido glutámico en el accumbens facilitó la exploración ( $80 \pm 10$  Cuentas vs  $50 \pm 9$  Cuentas, MSG vs SAL,  $p < 0.01$ , brazo Una Pared) y disminuyó la actividad no exploratoria ( $0 \pm 8$  Cuentas vs  $12.5 \pm 10$  Cuentas, MSG vs SAL,  $p < 0.05$ , brazo Pared Alta y Baja). En el huleboard no hubo efectos. La estimulación simultánea de hipocampo y accumbens con MSG anuló los efectos del MSG en el accumbens. Conclusión: MSG en el hipocampo modula la expresión del accumbens en las conductas exploratorias.

- 362. Regionalización funcional del hipocampo: papel de la histamina en los mecanismos cognitivos.** Edgardo O Alvarez, AM Banzan

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

Evidencias previas han mostrado que la activación de receptores histaminérgicos  $H_1$  del hipocampo ventral inhiben el aprendizaje de una respuesta de evitación activa. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad histaminérgica del hipocampo dorsal en el mismo esquema de aprendizaje. Se implantaron ratas con cánulas de microinyección en el hipocampo dorsal y diversos grupos se inyectaron con salina ( $n=12$ ), histamina (HA;  $n=10$ ) o histamina con antagonistas ( $n=13$  para cada antagonista) durante el aprendizaje de la respuesta de evitación. Los resultados mostraron que la dosis de 9 nmol histamina facilitó la eficiencia de aprendizaje de la respuesta ( $50 \pm 9.7\%$  vs  $0 \pm 11.5\%$ ,

HA vs Salino,  $p < 0.01$ , ensayo 3). Este efecto fue bloqueado por el antagonista  $H_2$  Ranitidina ( $33.3 \pm 10.9\%$  vs  $0 \pm 11.5\%$ , RAN+HA vs Salino, ensayo 3). En cambio, el antagonista  $H_1$  Pirilamina no tuvo efecto ( $66.7 \pm 10.3\%$  vs  $0 \pm 11.5\%$ , PYR+HA vs Salino, ensayo 3). Dosis más altas de histamina inhibieron la adquisición de la respuesta como previamente se encontró en el hipocampo ventral. En conclusión: los resultados sugieren una especialización regional de los receptores histaminérgicos del hipocampo en los procesos de memoria.

**363. Insula: relacion entre su superficie cortical y la de su base.** AM Albanese, A Merlo, E Gómez, A Ingratta, T Mascitti, R Román, E Albanese

*Facultad de Medicina, Universidad del Salvador; Facultad de Farmacia y Bioquímica y Facultad de Medicina, UBA; Fundación A. Di Rienzo, Buenos Aires*

La ínsula anterior, que ha sido relacionada con funciones del lenguaje presenta, según nuestros resultados, lateralidad morfológica izquierda como el área de Broca y el planum temporale. Se determinó la relación entre la superficie cortical (C) de la ínsula y la de su base (B) en la zona anterior (A) y en la zona posterior (P) correspondiendo cada zona a la respectiva mitad del eje anteroposterior de la ínsula. Se midieron las superficies C y B usando los mismos cortes coronales de resonancia magnética (RM) hechos cada 0.2 cm, de 18 voluntarias diestras de 18 a 22 años de edad clínicamente y en RM normales. Definimos como B a la superficie que resulta de unir con una línea recta los puntos donde la corteza de la ínsula se continúa con la corteza de las áreas vecinas. Se calculó la relación C/B para las zonas A y P en cada caso. Los valores (media  $\pm$  ES) izquierdos y derechos respectivamente de C/B son: en A  $1.52 \pm 0.03$  y  $1.41 \pm 0.03$  ( $p < 0.02$  ANOVA) y en P  $1.27 \pm 0.02$  y  $1.25 \pm 0.02$ . Las C/B de A y P presentan diferencias altamente significativas ( $p < 0.01$ , ANOVA). Conclusión: la región anterior izquierda de la ínsula tiene la mayor relación superficie cortical/base, lo que es de interés porque a la misma se le atribuyen funciones en el lenguaje.

**364. Efecto de la melatonina sobre el sueño y deterioro cognitivo en la enfermedad de Alzheimer (AD).** LI Brusco, M Márquez, DP Cardinali

*Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA*

El presente estudio abierto comprendió 8 mujeres y 6 hombres, edad media  $72 \pm 9$  años, con diagnóstico de AD efectuada 34-82 meses antes. Los pacientes recibieron 9 mg de melatonina p.o. a la hora habitual de sueño durante 22 a 35 meses. El sueño se evaluó mediante entrevistas estructuradas y agendas llenadas por los pacientes o sus cuidadores. La evaluación neuropsicológica fue efectuada mediante las escalas FAST (Functional Assessment Tool For AD), Mini-Mental, ADAS (AD Assessment Scale), Mattis y Blessed. En el comienzo del tratamiento todos los pacientes presentaron deterioro cognitivo y NMR o tomografía computada indicativas de atrofia cortical y bitemporal. La evaluación de la calidad del sueño y estado neuropsicológico antes y después del tratamiento con melatonina fue hecha por métodos no paramétricos (test de Mann-Whitney). Se detectó una mejoría significativa de la calidad de sueño ( $2.5 \pm 0.65$  vs.  $6.1 \pm 1.1$ , media  $\pm$  DS,  $p < 0.0001$ ), sin cambios significativos en FAST, Mini-Mental, ADAS y escalas de Mattis y Blessed. Clínicamente se observó detención de la evolución de la enfermedad en todos los casos. La agitación vespertal (sundowning) desapareció en 12 pacientes y se redujo en los otros 2. Estos datos indican que el tratamiento con melatonina puede detener la evolución de AD.

**365. Efecto de la melatonina en gemelos univitelinos con enfermedad de Alzheimer (AD).** LI Brusco, M Márquez, DP Cardinali.

*Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA*

Se estudió la evolución de AD (diagnosticada por criterio NINCDS-ADRDA) en dos gemelos univitelinos, diagnosticados 8 años atrás, con madre fallecida con el mismo diagnóstico. El comienzo de la enfermedad difirió 6 meses entre hermanos y fue caracterizado por deterioro cognitivo, con neuroimagen semejante en ambos gemelos. El tratamiento prescrito fue vitamina E (800 I.U./día) y desde hace 3 años, tioridacina (50 mg/día) debido a las alteraciones conductuales y del sueño (sundowning). Hace 3 años la evaluación neuropsicológica efectuada fue semejante en ambos gemelos, con un FAST (Functional Assessment Tool For AD) 5 (incapacidad para planear tareas complejas, falta de higiene) y Mini-Mental 10/30. Desde ese momento y durante 36 meses uno de los 2 hermanos recibió melatonina (6 mg p.o.) diariamente, interrumpiéndose en éste la tioridacina debido a la mejoría del sundowning. En la evaluación actual se observó en el gemelo tratado con melatonina reducción de la agitación vespertal y mejoría de la calidad del sueño, FAST 5 y Mini-Mental 10/30, mientras que el no tratado presentó un FAST 7b (falta de control de esfínteres, comprensión sólo de palabras aisladas) y Mini-Mental 0/30. Este caso es compatible con la hipótesis de que la melatonina puede estabilizar la evolución de AD, posiblemente por mejoría de la alteración del sueño.

**366. Efectos de la hiperbilirubinemia y factores de riesgo perinatal sobre parámetros funcionales de vía auditiva.** AA Yorio, Teresa Bertelli, Claudia Grubman, ET Segura

*Laboratorio de Fisiología del Comportamiento (IBYME-CONICET). Unidad Neurología (Hospital J.A. Fernández); Buenos Aires*

Se investiga la influencia de hiperbilirubinemia (HB) y factores de riesgo (FR) sobre potenciales evocados auditivos de tronco (PEAT) en recién nacidos de término y pretérmino. El registro PEAT se practicó a las 40-41 semanas (edad corregida) en cuatro grupos: 44 neonatos sin HB sin FR, 29 neonatos con FR sin HB, 22 neonatos con HB sin FR y 52 neonatos con HB y FR. Los niveles de bilirrubina de los grupos HB fueron  $36.2 \pm 4.2$  (sin FR) y  $26.5 \pm 2.3$  mg/l (con FR). Se verificaron efectos significativos sobre latencia I e intervalo I-V de HB ( $F = 10.724$ ,  $p < 0.01$ ,  $F = 13.504$ ,  $p < 0.001$ ), FR ( $F = 51.951$ ,  $p < 0.001$ ;  $F = 54.640$ ,  $p < 0.001$ ) y la interacción entre ambos factores ( $F = 20.601$ ,  $p < 0.001$ ;  $F = 33.350$ ,  $p < 0.001$ ). Se comprobó correlación positiva ( $p < 0.05$ ) entre nivel de bilirrubina y latencia onda V ( $r = 0.25$ ). Conclusiones: 1) La hiperbilirubinemia es un factor determinante de alteración a nivel de cóclea-nervio auditivo y tronco cerebral. 2) Los factores de riesgo inducen alteraciones neurosensoriales aún con niveles bajos de hiperbilirubinemia.

**367. Estudio del Complejo Receptor GABA<sub>A</sub>, sometido a hipoxia aguda prenatal, en el Sistema Nervioso Central en desarrollo.** DJ Rodríguez Gil, MS Viapiano, S Fiszler de Plazas

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

Se ha demostrado que la hipoxia produce desórdenes funcionales asociados a cambios en la neurotransmisión en el Sistema Nervioso Central. El objetivo del presente trabajo fue determinar las variaciones asociadas al complejo receptor GABA<sub>A</sub>, que produce una hipoxia aguda normobárica ( $O_2$  al 8%, por 60 minutos) sobre embriones de pollo, mediante ensayos de unión de [<sup>3</sup>H]GABA a membranas sinápticas aisladas de lóbulos ópticos (LO). En el día embrionario (DE) 12, el tratamiento no afectó la constante de afinidad de los receptores GABA<sub>A</sub>, pero sí produjo una disminución significativa en la máxima capacidad de unión (Control:  $5.476 \pm 0.202$ , hipóxico:  $3.904 \pm 0.392$  pmol/mg prot.,  $p < 0.05$ ). Una reducción similar se obtuvo en los DE 14 y 16. La hipoxia aumentó la estimulación de la unión de [<sup>3</sup>H]GABA que produce la alopregnanolona (DHP) en condiciones normales. En conclusión, el LO en desarrollo sometido a una hipoxia de corta duración, sufre una reducción significativa de los sitios receptores GABA<sub>A</sub> y un cambio en su modulación por DHP.

368. Efecto del tratamiento crónico *in ovo* con epipregnanolona sobre el complejo receptor GABA<sub>A</sub>. L Pignataro, AJ Ramos, HA Brusco, S Fiszler de Plazas

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

En el Sistema Nervioso Central de las aves se ha demostrado la síntesis de un esteroide 5 $\beta$ -reducido y 3 $\beta$ -hidroxilado, la epipregnanolona (Epi), la cual es más abundante en etapas tempranas del desarrollo. Nuestro objetivo es investigar el rol de este compuesto sobre el receptor GABA<sub>A</sub>. Luego de la administración crónica *in ovo* de Epi, se determinó la unión de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam ([<sup>3</sup>H]FNZ) y [<sup>3</sup>H]GABA a membranas sinápticas aisladas del lóbulo óptico de pollo. El tratamiento no afectó la unión de [<sup>3</sup>H]FNZ y [<sup>3</sup>H]GABA, ni la distribución y morfología de las neuronas GABAérgicas estudiadas por inmunocitoquímica con un anticuerpo monoclonal anti GABA. En los ensayos de unión de [<sup>3</sup>H]FNZ se demostró que la administración crónica de este esteroide redujo la CE<sub>50</sub> y E<sub>max</sub> de la alopregnanolona de 0.75 $\pm$ 0.15 a 0.23 $\pm$ 0.08 $\mu$ M (p<0.05) y de 105.79 $\pm$ 14.40 a 64.47 $\pm$ 7.29% (p<0.05), respectivamente; mientras que en los experimentos de [<sup>3</sup>H]GABA sólo se observó una reducción en el E<sub>max</sub> de 70.05 $\pm$ 6.06 a 51.37 $\pm$ 4.24% (p<0.05). Estos datos sugieren que este neuroesteroide endógeno es capaz de producir alteraciones en el acoplamiento alostérico de los sitios moduladores del receptor GABA<sub>A</sub>.

369. Modificaciones neuroquímicas inducidas por Allopregnanolona (ALL) en cuerpo estriado en ratas hembras. M Laconi, G Casteler, R Cabrera

LINCE-FCM-CRICYT- Mendoza

ALL es un neuroesteroide derivado de progesterona (P). Se ha demostrado que estas moléculas son capaces de modular diferentes sistemas de neurotransmisión. Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que Progesterona modula la liberación de dopamina inducida por NMDA. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de ALL sobre la actividad dopaminérgica en el cuerpo estriado (CE) de ratas en diferentes condiciones hormonales. Los grupos experimentales fueron: diestro (D), estro (E), ovariectomizadas impregnadas con estrógeno y progesterona (OVXi) y OVX sin impregnar. Los animales fueron inyectados intracerebro ventricular con ALL (5,2 $\mu$ M) o solución Krebs (KRB) como control. Se determinaron los niveles de DA y DOPAC por HPLC. Los resultados se expresaron en ng/mg de proteínas y como el índice de recambio (IR) DOPAC/DA. ALL indujo una disminución significativa de la concentración de DA y DOPAC en E y OVXi respecto a los controles; mientras que el IR no se modificó. La postulada acción moduladora no genómica de ALL sobre el sistema dopaminérgico del CE requeriría de la activación genómica previa de estrógeno y progesterona en esta área.

## REPRODUCCION I

370. Anomalías en el desarrollo embrionario temprano luego de la ingesta crónica de alcohol por hembras de ratón. Elisa Cebal, Andrea Lasserre, Valeria Rettori y Martha Gimeno.

CEFYO-CONICET, Buenos Aires

La pérdida embrionaria precoz es uno de los factores limitantes de la fecundación en humanos. Se vio que la ingesta crónica de etanol durante la gestación produce el síndrome de alcoholismo fetal en humanos (FAS). En este trabajo se estudió la influencia del consumo crónico de etanol materno en el desarrollo del embrión preimplantativo. Hembras murinas prepúberes recibieron etanol al 10% (m/v) en el agua de bebida por 30 días (HE) y los controles agua isocalórica con dextrosa (HC). Al día 27 se indujo la ovulación con PMSG y hCG, se ensayó la fecundación *in vitro*

y los embriones se cultivaron 7 días. Para el desarrollo *in vivo*, las hembras se aparearon con machos controles. En el desarrollo *in vitro* de las HE disminuyó el % (p<0.05 a p<0.01) de embriones de 2-células (HE:61 $\pm$ 4.2 vs HC:79.1 $\pm$ 3.3, n:8), de 4-células (34.2 vs 64.1 $\pm$ 3.0) y de mórulas compactadas (26.0 $\pm$ 5.0 vs 71.0 $\pm$ 4.5). En las HE, se redujo el % de blastocistos iniciales (5.4 $\pm$ 1.6 vs 36.2 $\pm$ 4.6) y expandidos (1.4 $\pm$ 0.7 vs 19.0 $\pm$ 2.7), con altos % de anomalías morfológicas (12.6 $\pm$ 4.5 vs 4.7 $\pm$ 1.2). Se vio escaso desarrollo *in vivo* de mórulas (15.3 $\pm$ 9.0 vs 67.4 $\pm$ 3.2) y alta fragmentación al día 4 (24.4 $\pm$ 7.1 vs 5.3 $\pm$ 3.5). Las anomalías morfológicas fueron similares a las *in vitro*. Concluimos que la ingesta crónica de alcohol por las hembras, resulta en una detención del desarrollo embrionario temprano, alteraciones morfológicas y aumento de fragmentación. Estos resultados apoyan las observaciones clínicas que muestran un porcentaje incrementado de abortos espontáneos en mujeres consumidoras de alcohol.

371. Efectos de interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) sobre el desarrollo de embriones murinos *in vitro*. <sup>1</sup>M Cameo, <sup>1</sup>V Fontana, <sup>1</sup>P Cameo, <sup>2</sup>L Vauthay, <sup>3</sup>M Tesone

<sup>1</sup>Biología de la Reproducción, <sup>2</sup>Instituto de Oncología A.H.Roffo, <sup>3</sup>Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires

El efecto embriotóxico de sueros de pacientes con algunas patologías reproductivas, fue descrito por diferentes autores. La correlación entre dicho efecto y la producción de IFN- $\gamma$ , sugiere que éste es un responsable de la embriotoxicidad. La detección de embriotoxinas en sueros se realiza cultivando embriones de ratón de 2 células hasta blastocisto en presencia de los mismos. Para investigar si el IFN- $\gamma$  está involucrado en la embriotoxicidad, estudiamos el efecto del agregado de IFN- $\gamma$  exógeno al medio de cultivo sobre el desarrollo embrionario murino. Se cultivaron embriones de ratón de 2 células en presencia de suero humano control (10%) con (n=130) o sin (n=100) el agregado de hIFN- $\gamma$  (10 $\mu$ g/ml) a tres tiempos distintos (día 0, 3 y 5). Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Se evaluó la proporción de blastocistos, *attachment* y *spreading* de los trofoblastos y se calcularon las medias de los %  $\pm$  SEM. Los datos se evaluaron por ANOVA o X<sup>2</sup>. El agregado de IFN- $\gamma$  no produjo una diferencia significativa en el % de blastocistos y en el de *attachment* comparados con sus controles. La presencia de IFN- $\gamma$  alteró significativamente el *spreading* del trofoblasto a los 7 días de cultivo respecto al control (agregado en el día 0: 0% vs 68 $\pm$ 16%; en el día 3: 16 $\pm$  12% vs. 68 $\pm$  16%; en el día 5: 7 $\pm$ 7% vs. 68 $\pm$ 16%). Se concluye que: IFN- $\gamma$  tiene efecto embriotóxico sobre el desarrollo de embriones murinos *in vitro*; 7 días de cultivo permiten detectar efectos embriotóxicos no observables a 3 días utilizados rutinariamente en ensayos de embriotoxicidad.

372. Efecto de endotoxinas sobre desarrollo embrionario temprano. P Saragueta, C Otto, R Schultz.

Department of Clinical Studies, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA

Modificaciones génicas producidas por infecciones bacterianas podrían causar efectos directos sobre el desarrollo embrionario temprano, es de sumo interés el estudio de los efectos de bajas concentraciones (no tóxicas) de lipopolisacáridos (LPS). Por otra parte, el porcentaje de blastocistos obtenidos de cultivos *in vitro* es considerablemente menor a los desarrollados *in vivo*. La presencia de endotoxinas podría ser una de las causas de estos efectos. Para estudiar el efecto de LPS bacterianos sobre el desarrollo embrionario preimplantatorio en ratón, se ensayaron concentraciones crecientes de LPS (5 ng/ml-5 $\mu$ g/ml) desde el estadio de 2 células al de blastocisto. El efecto del tratamiento fue evaluado por los cambios morfológicos y la viabilidad durante el cultivo, observándose un efecto bifásico (0: 93%, 50 ng/ml: 50.1%, 500 ng/ml: 75.9% 50 mg/ml: 34.4% de blast). A su vez se evaluaron por RT-PCR semicuantitativa, los niveles de mensajeros de enzimas involucradas en la detoxificación de especies generadas por stress oxidativo. Los niveles de mRNA de las enzimas MnSOD

y CuSOD (50 ng/ml: 58%, 500 ng/ml: 42% del control) correlacionaron con los cambios observados en el desarrollo, no ocurrió lo mismo con las enzimas involucradas en la generación de glutatión reducido (GSH). Tratamientos con 50-100-500 ng/ml de LPS indujeron la expresión de TNF- $\alpha$ . Con el objetivo de localizar receptores de LPS se realizaron ensayos de unión y competencia de LPS marcado con lectinas fluorescentes (FITC-LPS) registrados por microscopía confocal. Conclusión: a) Se detectó efecto de LPS sobre el desarrollo y b) la expresión de enzimas involucradas en detoxificación así como del factor TNF- $\alpha$  c) Se comprobó la presencia de receptores específicos para LPS en embriones de ratón durante el período preimplantatorio

**373. Actividad funcional de espermatozoides epididimarios de ratón sometidos a administración pre o postnatal de etanol.** JM Busso, G Stutz, RD Ruiz, JL Lacuara

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

Dado que etanol (E) es frecuentemente consumido por el hombre y se lo considera deletéreo sobre las funciones reproductoras, nos propusimos determinar los efectos de dosis equivalentes a las habituales en etilistas importantes, sobre motilidad, vitalidad, resistencia al shock hipoosmótico, reacción acrosomal (RA) e índice de fertilización *in vitro* en espermatozoides de ratones Albino swiss adultos. Se administró (i.p.) E: 0.87 g/Kg/día (E1) ó 1.20 g/Kg/día (E2) a machos durante 35 (A) ó 60 días (B) y a hembras durante los días 5-18 de la gestación (C); los controles recibieron solo el vehículo (Cl Na isotónico). Se evaluaron también los efectos de la adición *in vitro* del principal metabolito endógeno, acetaldehído (AC) (0.125, 0.25 y 1 mM). En A, B y crías adultas de C no se observaron diferencias con sus controles, salvo incremento del porcentaje de gametas no progresivas en A-E2 (Control 5.75 $\pm$ 0.79, n=24; A-E1 5.92 $\pm$ 1.10, n=12; A-E2 12.27 $\pm$ 2.37, n=11; p<0.05) y del porcentaje de RA con AC 1 mM (concentración sólo alcanzable en modelos experimentales). Estos resultados concuerdan con estudios previos que, aún con dosis superiores, informan fenómenos de reversibilidad espontánea y sustentan la idea de que en general la infertilidad obedece a causas multifactoriales y sólo excepcionalmente puede atribuirse a una variable única. Trabajo incluido en el PRIDRAH-CONICET.

**374. Comparación de la eficacia de glicerol y etilenglicol para la crioprotección de espermatozoides electroyacuados de *Chinchilla laniger*.** R Carrascosa, AC Martini, MF Ponzio, M Fiol de Cuneo, RD Ruiz, AA Ponce

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

Hasta el presente, dentro de los componentes del medio crioprotector de las gametas, glicerol (GI) es más frecuentemente usado que etilenglicol (Et). El objetivo de este estudio fue comparar la eficacia de ambas amidas (1M) para la criopreservación de espermatozoides electroyacuados de *Chinchilla* almacenados a 4°C durante 24 ó 72 h en medio TES-Tris-Yema de huevo. Se determinaron porcentajes de gametas móviles (M; Cámara de Makler), vivas (V, tinción con H258) ó reactivas e íntegras al shock hipoosmótico (PRO, incubación en solución citrato-fructosa, 100 mOsm). A las 24 h, M y PRO disminuyeron significativamente en presencia de GI con respecto a Et (M: 85.9 $\pm$ 2.1 y 92.4 $\pm$ 1.8; n=8; p<0.05. PRO: 62.9  $\pm$ 3.6 y 69.1 $\pm$ 4.7; n=6; p<0.05, para GI y Et respectivamente. A las 72 h, en PRO y V se detectó un fenómeno similar (PRO: 38.8 $\pm$ 8.5 y 54.6 $\pm$ 7.0; n=5; p<0.05. V:66.2 $\pm$ 10.7 y 82.0 $\pm$ 8.4; n=7; p<0.05, para GI y Et respectivamente). De los resultados expuestos puede inferirse que en *Chinchilla Laniger*. a) el almacenamiento a 4°C es un recurso económico que conserva durante plazos considerables la actividad funcional espermática; b) Et añadido al medio crioprotector es más eficaz que GI, al menos cuando las gametas son enriadas, sin llegar al punto de congelamiento. Subsidiado por CONICET, CONICOR y SECyT-UNC e incluido en el PRIDRAH-CONICET.

**375. Efectos de una suplementación dietaria con ácidos grasos de la serie n3 sobre la fisiología y capacidad fertilizante de ratones.** ME Santillán, RD Ruiz, LM Vincenti, AA Ponce, JL Lacuara

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

Comparamos los efectos de una dieta suplementada con derivados de ácido alfa linoléico (LN, 18:3n-3) vs otra deficiente en ácidos grasos esenciales (DAGE), suministradas a ratones macho Albino swiss desde el destete durante 2 a 6 meses, sobre la concentración (C), motilidad (M), vitalidad (V), respuesta al shock hipoosmótico, integridad del acrosoma (IA), índice de fertilización *in vivo* (FIVO) e *in vitro* (FIV). El componente lipídico de LN fue aceite de hígado de bacalao y el de DAGE fue oleína (18:1n-9). Asimismo se evaluó el efecto de una dieta a la que se agregó, en una proporción 1:1 (v/v), aceite de hígado de bacalao y oleína (LNO). Un lote control recibió alimento comercial (COM). Los parámetros evaluados para describir la fisiología espermática no mostraron diferencias significativas en ninguno de los grupos. La FIV disminuyó significativamente en LN y DAGE en todos los períodos vs LNO y COM. La FIVO fue decreciendo gradualmente en LN, siendo significativas las diferencias vs los otros 3 grupos a partir de los 3 meses, hasta alcanzar valores del 16% a los 6 meses. IA fue significativamente inferior (p<0.05) en LN, con respecto a todos los otros grupos, desde los 2 a los 5 meses. Los resultados sugieren que el aporte de LN en forma exclusiva puede tener efectos más deletéreos sobre la capacidad reproductiva que la privación total de ácidos grasos esenciales. Subsidiado por CONICET, CONICOR y SECyT-UNC e incluido en PRIDRAH-CONICET.

**376. Modificaciones inducidas por progesterona y pentoxifilina en algunos parámetros funcionales de espermatozoides bovinos.** LM Vincenti, JM Sad Larcher, M Fiol de Cuneo, RD Ruiz, AA Ponce

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

Capacitación, motilidad hiperactivada y reacción acrosomal son procesos esenciales para que el espermatozoide adquiera capacidad fertilizante. Estos eventos pueden ser reproducidos *in vitro* por adición de agentes fisiológicos o farmacológicos. Se investigaron en espermatozoides bovinos descongelados los efectos de pentoxifilina (PX) 5mM (4h de incubación) y progesterona (P<sub>4</sub>) 10 $\mu$ M, (20 min post-capacitación) sobre el porcentaje de gametas móviles (M), vivas (V) ó con acrosoma reaccionado (AR). PX provocó una disminución significativa de M y V (p<0.05), mientras que P<sub>4</sub> no modificó estos parámetros. La adición de P<sub>4</sub> ó P<sub>4</sub> + PX, aumentó significativamente RA (23.00 $\pm$ 4.02, 20.57 $\pm$ 2.68 y 20.94 $\pm$ 2.13, respectivamente) respecto al control (11.21 $\pm$ 1.55), (n=8 en todos los grupos). La disminución de M y V provocada por PX podría deberse a que el aumento de AMPc intracelular modifica el metabolismo, llevando al agotamiento celular. El aumento de RA provocado por P<sub>4</sub> y PX, indica que las gametas se encuentran capacitadas luego de las 4 h de incubación y sugiere que los agentes empleados actúan como inductores o moduladores de este fenómeno. Subsidiado por CONICET, CONICOR y SECyT-UNC e incluido en el PRIDRAH-CONICET.

**377. Efectos de señales fisiológicas sobre la actividad funcional de espermatozoides bovinos criopreservados.** LM Vincenti, M Fiol de Cuneo, AA Ponce, AC Martini, JJ Calvete\*

*Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba; \*Instituto de Biomedicina, C.S.I.C., Valencia, España.*

A fin de determinar las posibles influencias ejercidas por agentes normalmente presentes en los microambientes a que son expuestos los espermatozoides previamente a la fecundación se in-

vestigaron, en gametas bovinas criopreservadas, los efectos de PDC-109 (espermedesina plasmática bovina) y una fracción de fluido folicular homólogo (FFb<sub>2</sub>, obtenido por elución en columna de Sephacryl HR-500). Se evaluaron los porcentajes de gametas móviles (M), vivas (V) y con reacción acrosomal (RA). Luego de descongelados, los espermatozoides fueron incubados en medio de Tyrode modificado (BSA 3 mg/ml y heparina 10 µg/ml) para su capacitación. Se realizó una curva concentración-respuesta no acumulativa a PDC-109 (0.1, 0.5, 1.5 ó 3 mg/ml) adicionada durante las 4 h de capacitación. V y M disminuyeron y RA aumentó significativamente (control: 13.1±0.1 vs 26.7±6.0; 28.4±4.1; 22.8±4.1 y 29.1±6.5 % respectivamente, n=7, p<0.05). En presencia de PDC-109 (1.5 mg/ml), FFb<sub>2</sub> (1 mg/ml, 20 min post-capacitación) disminuyó significativamente los porcentajes de gametas móviles y progresivas; mientras que 0.5 y 1 mg/ml redujeron V; no se detectaron efectos de FFb<sub>2</sub> sobre RA. La unión de PDC-109 a la membrana espermática y el secuestro de lípidos que se le atribuye, explicarían los efectos de la espermedesina sobre los parámetros descriptos. Se requieren estudios adicionales de distintas fracciones de FFb, para detectar la presencia de moduladores de la actividad funcional espermática. Subsidiado por CONICET, CONICOR, SECyT-UNC e incluido en el PRIDRAH-CONICET.

### 378. Efecto del antioxidante a-tocoferol en el manejo in-vitro del espermatozoide. A Caille, MJ Munuce, F Pauluzzi

Laboratorio de Estudios Reproductivos, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas UNR, Rosario

El espermatozoide humano (S) genera especies oxígeno reactivas (ROS) que, a través de la peroxidación de lípidos (LP), afectan su membrana plasmática. El antioxidante α-tocoferol (α-T) capta radicales generados durante la acción de ROS. Se evaluó la efectividad del α-T en la LP y en la generación de ROS durante el manejo in vitro del S. Se trabajó con S lavados de muestras normozoospermicas y <1.10<sup>6</sup> leucocitos/ml (n=19). A alícuotas de cada muestra, con o sin α-T (10 mM), se amplificó LP agregando Fe<sup>2+</sup>/Ascorbato (FA). Se evaluó LP y ROS mediante: test del ácido tiobarbitúrico y sonda luminol. No se observó diferencia significativa entre medias de LP ni al adicionar α-T, ni con inducción con FA. En presencia de α-T, el efecto de FA en LP disminuyó 8 veces en las 10 muestras que respondieron a dicha inducción. La generación de ROS luego de incubar 1h aumentó 640% respecto de su valor en el semen (p<0.001), mientras que en presencia de α-T aumentó 220%. El uso del α-T no disminuye significativamente la LP durante el manejo in-vitro del S, ni la producción de ROS. La cantidad de ROS generadas sería independiente de LP. En conclusión, los resultados indican un efecto antioxidante moderado del α-T dependiente de las características de la muestra. Financ. PLACIRH PLI-266/96

### 379. Efecto del fluido peritoneal sobre la reacción acrosomal inducida de espermatozoides humanos. MJ Munuce<sup>1,2</sup>, A Caille<sup>1</sup>, C Berta<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Estudios Reproductivos, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. <sup>2</sup>Cátedra de Ginecología. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario.

El fluido peritoneal (FP) participa del microambiente donde ocurre la fertilización del ovocito. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto del FP sobre la reacción acrosomal inducida (RA). Se utilizó el FP de mujeres estériles sin patología peritoneal, aspirado laparoscópicamente en fecha perioperatoria y los espermatozoides de pacientes normales, libres de anticuerpos. Los mismos fueron seleccionados por Percoll y capacitados en medio Human tubal fluid. Se realizó una incubación de 1 h con FP al 50% v/v, luego de lo cual se indujo la RA tanto con ionóforo (I) de calcio A23187(10µM) como con fluido folicular (FF) al 20% v/v. La RA se visualizó por tinción con Pisum sativum, evaluando 200 células. Los resultados se expresan como media ± SEM y se analizaron por pruebas no paramétricas. El FP disminuyó la RA indu-

cida respecto a los controles sin FP, tanto para el I (18.9±5.1 vs 45.6±5.0 %, p<0.001) como para el FF (7.7±3.0 vs 13.0±4.9%, p<0.05) sin afectar su vitalidad. El FP actuaría modulando la habilidad de sufrir la RA para que esta se gatille en las vecindades del ovocito y no antes.

## RIÑÓN

### 380. Regulación adrenérgica de la captación de dopa en células tubulares renales aisladas. Andrea Carranza, Susana Nowicki, Marta Barontini, Ines Armando.

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

Uno de los pasos limitantes de la síntesis de dopamina (DA) en células tubulares renales es la captación de su precursor, l-dopa. Los mecanismos que regulan esta captación, sin embargo, han sido poco explorados. Las células tubulares renales poseen receptores α y β adrenérgicos y estos receptores han sido involucrados en la regulación del transporte de aminoácidos en hepatocitos. El objetivo de este trabajo fue determinar, en células aisladas de túbulo contorneado proximales renales, el efecto de agonistas α y β sobre la captación de dopa y la síntesis de DA. Las concentraciones de dopa intracelulares y la producción de DA al medio fueron determinadas por HPLC-ED. La captación de l-dopa (200nM) fue inhibida por la presencia en el medio (10-6M) de agonistas α (Isoproterenol, 50%; Terbutalina, 50%) o de agonistas mixtos (Noradrenalina, 40%; Adrenalina, 30%) y que no fue afectada por agonistas α. La inhibición de la captación de dopa por Isoproterenol fue dosis dependiente. Los efectos de Isoproterenol, Noradrenalina y Terbutalina (agonista β2), tanto sobre la captación de dopa como sobre la producción de DA, fueron revertidos completamente por la presencia en el medio de ICI 118.551 (10-7M), un antagonista β2. Estos resultados sugieren una regulación β2 adrenérgica de la captación de l-dopa en células tubulares renales.

### 381. Modificaciones en espectrina y ATPasa Na/K en corteza renal de rata sometida a isquemia. G Coux, L Trumper, MM Elías

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

Se evaluó el efecto de isquemia en corteza renal sobre la cantidad y calidad de dos proteínas: ATPasa Na/K y espectrina. La espectrina es una proteína del citoesqueleto que ha sido descrita como blanco de proteasas activadas durante isquemia. Se trabajó con ratas Wistar macho controles (C) y sometidas a 5, 40 y 100 minutos de isquemia unilateral (I). En homogenados de corteza se determinaron proteínas, ATP y actividad de ATPasa Na/K. Los homogenados fueron sometidos a SDS-PAGE, transferidos a membranas de nitrocelulosa y revelados con anticuerpos anti-ATPasa Na/K y anti-espectrina. El contenido de ATP presentó diferencias significativas desde I5: C: 0.49±0.04, I5: 0.33±0.03 µmol/g corteza, p<0.01. La actividad de ATPasa disminuyó a partir de I40 (C: 8.8±2.9, I40: 4.5±0.9 µmol Pi/h.mg prot, p<0.05). Se observó un aumento de ATPasa Na/K en función del tiempo de isquemia y una marcada proteólisis de la espectrina. Ciertos productos de dicha degradación aumentaron progresivamente en función del tiempo de isquemia. Estos resultados nos permiten sugerir que durante isquemia hay un aumento de la cantidad de ATPasa Na/K, que en el transcurso del tiempo no se expresa como aumento en la actividad. Se sugiere que una probable causa sería la alteración en el citoesqueleto puesta de manifiesto por la degradación de espectrina.

### 382. Daño tubulointersticial en riñón remanente. Jorge Toblli, G De Rosa, C Nyberg, M Angerosa

Laboratorio de Medicina Experimental, Hospital Alemán, Buenos Aires

El motivo de este estudio fue evaluar los cambios tubulointersticiales (TI) en un modelo de riñón remanente por nefrectomía 5/6 (Nx5/6). Se utilizaron machos SD (250-300g), G1 Nx5/6 (n=15) y G2 Sham (n=15). Ambos G con agua y alimento estándar (18% proteínas). Duración del experimento 24 semanas. Se evaluó presión arterial sistólica (PAS) por "tail cuff" mensualmente y se determinó: creatinemia (Cr) y proteinuria (PrU). Se realizó estudio anatomopatológico para evaluar por un score las alteraciones TI (0= ausentes; 1= leves; 2= moderadas y 3= graves. Se determinó: 1) porcentaje de esclerosis focal y segmentaria (% EFS), 2) inmunoexpresión de  $\alpha$ -SMA (SMA) intersticial, respecto al área total. Resultados ( $X \pm SEM$ ): 1) EFS, G1: 15,4 $\pm$ 2,8; G2: 0,4 $\pm$ 0,2 ( $p < 0.01$ ). 2) Score TI, G1: 1,2 $\pm$ 0,1; G2: 0,1 $\pm$ 0,1 ( $p < 0.001$ ). 3) SMA G1: 1,8 $\pm$ 0,07; G2: 0,6 $\pm$ 0,02 ( $p < 0.001$ ). 4) Cr.(mg/dl) G1: 1,8 $\pm$ 0,1; G2: 0,6 $\pm$ 0,1 ( $p < 0.001$ ); 5) PrU (mg/día) G1: 152,8 $\pm$  14,1; G2: 5,1 $\pm$ 0,7 ( $p < 0.001$ ). Las lesiones TI se correlacionaron en forma positiva y significativa con: 1) Cr. ( $r = 0,708$   $p < 0.01$ ); 2) PrU ( $r = 0,757$   $p < 0.01$ ); 3) SMA ( $r = 0,745$   $p < 0.01$ ). y la marcación intersticial de SMA con la PrU ( $r = 0,819$   $p < 0.01$ ). Conclusiones: el daño funcional (ascenso de Cr y mayor PrU) se relacionó significativamente con las lesiones TI.

### 383. Evolución temporal de las alteraciones de membranas plasmáticas de túbulo proximal isquémico. G Coux, L Trumper, MM Elías

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

Se estudió la alteración en las células del túbulo proximal durante la evolución de insuficiencia renal aguda isquémica en ratas. Se trabajó con animales controles (C) y sometidos a 5 (I5), 10, 20 y 40 (I40) minutos de isquemia unilateral. La uremia aumentó significativamente a partir de los 20 minutos de isquemia (C: 0.32 $\pm$ 0.01, I20: 0.40 $\pm$ 0.02 g/l,  $p < 0.05$ ). En corteza renal se analizó la actividad de ATPasa Na/K, Fosfatasa Alcalina (FA) y contenido de ATP. La actividad de ATPasa sólo se modificó en I40 (C: 8.8 $\pm$ 2.9, I40: 4.5 $\pm$ 0.9  $\mu$ mol/h.mg prot,  $p < 0.05$ ). El contenido de ATP presentó diferencias significativas desde I5: C: 0.49 $\pm$ 0.04, I5: 0.33 $\pm$ 0.03  $\mu$ mol/g corteza,  $p < 0.01$ . A partir de corteza renal de animales controles y sometidos a 5 y a 40 minutos de isquemia se prepararon vesículas de membranas basolaterales (BL) y apicales (A) en base a sus diferentes densidades. Se determinó la actividad de ATPasa Na/K, FA y proteínas. Las fracciones conteniendo ATPasa en I5 mostraron un desplazamiento significativo de la actividad hacia densidades mayores, mientras que en A hubo disminución significativa de FA. I40 promovió una disminución en la actividad ATPasa y FA sin modificaciones en sus patrones de distribución en función de la densidad. Estos datos sugieren que las alteraciones en las células del túbulo proximal durante isquemia, ocurren asociadas a la depleción de ATP, y muestran un patrón distinto según el tiempo de isquemia transcurrido.

### 384. Síndrome nefrótico por adriamicina. Aspectos morfológicos y funcionales. Jorge Toblli, Rosa G De, Cao G, M Angerosa, C Nyberg

Laboratorio Medicina Experimental, Hospital Alemán, Departamento de Patología, Hospital de Clínicas José de San Martín, Buenos Aires

Con el objetivo de evaluar los cambios morfológicos y funcionales del síndrome nefrótico (SN) por administración de adriamicina (AD) y correlacionarlos con la presión arterial (PA) y la función renal, se hizo este estudio. Machos SD adultos. G1 (n=19) SN y G2 (n=18) control. El G1 recibió AD 7,5mg/Kg, dosis única IV y el G2 vehículo. Duración del estudio 60 días. Se determinó a los 15 y 60 días: proteinuria (PrU), creatinemia (Cr.), proteinemia (PrS), albuminemia (Alb), colesterol (Col), triglicéridos (TG) y PA. Se estableció un score de esclerosis glomerular (EG) y lesiones tubulointersticiales (LTI): 0= aus; 1= <25%; 2= 25-50%; 3= 51-75%; 4= >76%. Resultados ( $X \pm DS$ ): 1) PrU (mg/día) G1= 412,5 $\pm$  62,7; G2=0,7 $\pm$  1. 2) Cr.(mg/dl) G1= 1,1 $\pm$  0,2; G2=0,5 $\pm$  0,1.

3) PrS (g/dl) G1= 5,1 $\pm$  0,3; G2=6,6 $\pm$  0,3. 4) Alb (g/dl) G1= 2,3 $\pm$  0,4; G2=3,8 $\pm$  0,2. 5) Col (mg/dl) G1= 396,3 $\pm$  88,1; G2=36,2 $\pm$  6,6. 6) TG(mg/dl) G1= 326,4 $\pm$  112,9; G2=33,7 $\pm$  6,1. 7) EG G1= 3 $\pm$  0,8; G2=0,17 $\pm$  0,3. 8) lesiones TI G1= 2,5 $\pm$  0,9; G2=0,11 $\pm$  0,3. 9) PA(mmHg) G1= 141,3 $\pm$  5,7; G2= 121,6 $\pm$  2,8. Correlación entre EG y a) PA ( $r=0,7301$ ), b) PrU ( $r=0,8045$ ), c) Cr. ( $r=0,3305$ ); LTI y a) PrU ( $r=0,64$ ), b) Cr. ( $r=0,8633$ ). El SN por AD es un modelo de EG asociado a severas LTI que guardan mayor relación con el deterioro de la función renal que el grado de EG.

### 385. Efecto de antagonistas dopaminérgicos sobre el sistema DOPA/DA renal y la excreción de sodio en ratas hipotiroideas. JA Del Compare, Marta Barontini, Inés Armando

Centro de Investigaciones Endocrinológicas CEDIE-CONICET, Hospital de Niños R Gutiérrez, Buenos Aires

La dopamina (DA) de producción renal tiene un papel importante en la regulación de la excreción de sodio. Hemos demostrado en trabajos anteriores que las hormonas tiroideas afectan la producción de DA renal; en particular la disminución de las hormonas tiroideas producida por la administración de 2-tiouracilo aumenta la excreción urinaria de DA. El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos de antagonistas dopaminérgicos sobre este incremento de la DA renal en ratas con déficit de hormonas tiroideas. Para ello, grupos de ratas controles y tratadas durante 21 días con 2-tiouracilo se trataron con SCH-23390 (antagonista DA1, 1mg/kg/día sc, en dos dosis) o sulpirida (antagonista DA2, 6mg/kg/día im, en dos dosis). Se recolectó orina de los animales durante las 24hs previas al tratamiento y durante el día de tratamiento. En ella se determinaron DOPA, DA y DOPAC por HPLC-DE, se midió el volumen urinario y el Na<sup>+</sup> por fotometría de llama. SCH-23390 produjo una disminución significativa en el volumen urinario ( $p < 0.05$ ), la excreción de Na<sup>+</sup> ( $p < 0.05$ ) y la excreción urinaria de DOPA ( $p < 0.01$ ) de las ratas controles sin alterar las excreciones de DA o DOPAC. Sulpirida disminuyó la excreción de Na<sup>+</sup> ( $p < 0.05$ ) en animales controles sin alterar las otras variables estudiadas. Ni SCH-23390 ni sulpirida produjeron cambios en los parámetros estudiados en las ratas tratadas con tiouracilo. Estos resultados muestran que en el hipotiroidismo está alterada la respuesta a los antagonistas DA1 y DA2 y sugieren que podría haber una alteración en los receptores dopaminérgicos.

### 386. Nefrotoxicidad del aluminio: efectos secuenciales de una intoxicación crónica. S Mahieu, N Millen, M Gonzalez, M Contini, D Orihuela, MM Elías

Fisiología Humana, Facultad Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL, Santa Fe

A fin de investigar el desarrollo de la nefrotoxicidad crónica del aluminio (Al), se estudiaron ratas tratadas (T) desde el doteo con Al(OH)<sub>3</sub> (80 mg/Kg peso, i.p., 3 veces por semana), al final de 1, 2, 3, 4, 5, y 6 meses de exposición. Los datos se compararon con controles (C) de igual grupo etario. Se controló el peso corporal, se midieron parámetros bioquímicos plasmáticos y urinarios asociados a la función renal y el contenido de Al, glutatión (GSH) y de glutatión-S-transferasa (GST) en tejido renal. Se observó una reducción del peso corporal a partir de la 16ª semana de tratamiento. Los homogenizados renales mostraron una acumulación progresiva de aluminio (620  $\mu$ g/g tej.h.-6º mes), una reducción en la actividad de GST (nmol/min/g prot) a partir del 1º mes (T: 140 $\pm$ 17, C: 346 $\pm$ 27) y de GSH ( $\mu$ mol/gr tej.h.) a partir del 3º mes (T: 1.65 $\pm$ 0.14; C: 2.52 $\pm$ 0.20). No hubo modificaciones en los niveles plasmáticos de urea, creatinina, ni proteínas totales, y se observó un aumento en la excreción de Na<sup>+</sup> y proteínas desde el mes 2, y una disminución en la carga excretada de creatinina al mes 5, sin cambios significativos en la diuresis, clearance osmolar, excreción de  $\gamma$ -Glutamil Transferasa y K<sup>+</sup>. Los datos describen una secuencia de aparición de daño renal, más temprana sobre los sistemas metabólicos, luego sobre la permioselectividad glomerular, y por último en algunos parámetros de la función renal.

- 387. Análisis de polimorfismos del gen PKD1 en pacientes con poliquistosis renal autosómica dominante.** Mariana L. Manrique, Diana M Iglesias, Elvira Arrizurieta, AR Kornbliht, Mariana Herrera, Viviana Bernath, RS Martin

*Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Laboratorio de Fisiología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de Buenos Aires y Biología Molecular Diagnóstica, Buenos Aires.*

La poliquistosis renal es una enfermedad hereditaria autosómica dominante, causada por mutaciones descritas en al menos dos genes, PKD1 y PKD2, ubicados en los cromosomas 16 y 4 respectivamente. La técnica de SSCP ha sido utilizada para detectar mutaciones. Con el objeto de investigar la presencia de mutaciones en el gen PKD1 en la población argentina, se estudiaron 20 individuos sanos y 20 afectados con la enfermedad. Para ello se extrajo ADN genómico de sangre periférica, se amplificó por PCR con *primers* específicos del exón 45 del gen (sitio donde han sido ya descritas mutaciones en otras poblaciones) y se estudió el patrón de bandas resultante. En el análisis se encontraron dos patrones distintos de bandas, en 29 y 11 individuos, respectivamente. Ambos patrones fueron compartidos por individuos sanos y afectados. Se concluye que el patrón de SSCP observado en el exón 45 de nuestra serie correspondería a un polimorfismo no asociado a la enfermedad, dato que debe precisarse por secuenciación.

## METABOLISMO

- 388. Efecto de agentes porfirinogénicos sobre las actividades de las enzimas  $\gamma$ -aminolevulíco sintetasa, acetil y pseudocolinesterasa de cerebro.** Jorge Rodríguez, AM Buzaleh, A Batlle

*CIPYP - CONICET - Departamento de Química Biológica - FCEyN - UBA*

Todas las porfirias hepáticas agudas presentan síntomas neurológicos cuya patogénesis permanece sin esclarecer. La biosíntesis del hemo es regulada por la enzima  $\gamma$ -aminolevulíco sintetasa (ALA-S), la cual es inducible por agentes que causan porfiria experimental. El ALA, sintetizado por el ALA-S, parece ser el responsable de dichas manifestaciones neuropsiquiátricas. Los oxí-radicales generados por el ALA causan lesiones oxidativas en las membranas sinápticas de cerebro y disminuyen la afinidad por los receptores GABAérgicos. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de conocidos agentes porfirinogénicos sobre las actividades de ALA-S, acetil-colinesterasa y butirilcolinesterasa de cerebro de ratón. El AIA (350 mg/kg, i.p.) no produjo alteraciones significativas en la actividad del ALA-S. Tampoco se observaron variaciones por el ayuno durante 24 horas o la administración tóxica de griseofulvina. Los anestésicos Enflurano e Isoflurano (2ml/kg, i.p.), indujeron la actividad del ALA-S a valores de  $0,287 \pm 0,072$  ( $p < 0,05$ ) y  $0,242 \pm 0,031$  ( $p < 0,01$ ) respectivamente (control:  $0,128 \pm 0,086$ ). Resultados similares se obtuvieron con etanol (30% en el agua de bebida durante 1 semana) o con Veronal (3 dosis de 167 mg/kg, s.c.). También se estudió la administración de Isoniacida y de anestésicos en forma crónica. La actividad de pseudocolinesterasa resultó significativamente disminuida por los distintos tratamientos.

- 389. Porfiria Cutánea Tardía: Análisis de la población argentina.** Manuel Mendez, V Parera, MV Rossetti, A De Siervi, A Batlle

*CIPYP, FCEyN-UBA-CONICET, Buenos Aires*

La Porfiria Cutánea Tardía (PCT) es la consecuencia de una falla en la Uroporfirinógeno Decarboxilasa (URO-D) y puede ser familiar (PCT-F) o adquirida (PCT-A), en esta última el defecto

enzimático está limitado al hígado, por lo tanto ambas pueden diferenciarse por la determinación de URO-D en sangre. La PCT generalmente es desencadenada por diversos factores tales como el alcohol, hidrocarburos polihalogenados, metales y drogas porfirinogénicas. Es notable la relación entre PCT y otras patologías como diabetes, virus hepatotrópicos y de inmunodeficiencia adquirida. En el CIPYP se diagnosticaron 896 casos de PCT, siendo la relación hombre:mujer de 5:1. El 50% de los pacientes tenían entre 41 y 60 años, el 25% más de 60, el 22% entre 19 y 40 años y el 3% restante PCT-Infantil. El 47% de los pacientes ingería más de 60 g diarios de alcohol, el 12% tuvo contacto con plaguicidas, el 9% era diabético, el 6% recibió tratamiento hormonal, el 4% era HIV(+) y un 2% estuvo medicado con antiepilépticos; además la prevalencia del HCV en la población PCT es del 35%. En 106 pacientes no relacionados se determinó la URO-D eritrocitaria observándose que el 24,5% correspondía a PCT-F; en este estudio se incluyeron 60 pacientes con estudio hepático de los cuales 37 presentaban algún tipo de hepatopatía, la mayoría causada por HCV. De los pacientes con daño hepático el 22 % era PCT-F.

- 390. Porfiria Aguda Intermitente: Análisis bioquímico de la población argentina.** A De Siervi, MV Rossetti, M Mendez, VE Parera, H Muramatsu, A Batlle

*CIPYP - CONICET - FCE y N - UBA, Buenos Aires*

La porfiria aguda intermitente (PAI), la más común de las porfirias agudas hepáticas, se hereda como un carácter autosómico dominante. La expresión clínica se caracteriza por la presencia de ataques agudos precipitados por factores ambientales, drogas terapéuticas, etc. Los ataques agudos comienzan con fuertes dolores abdominales, seguidos por el desarrollo de una neuropatía periférica, que puede producir parálisis respiratoria y muerte. La prevalencia de la PAI se estimó en alrededor de 2-7/100.000 en diferentes países. En este trabajo, analizamos los datos bioquímicos de todas las familias argentinas con PAI estudiadas en el CIPYP en los últimos 20 años. Los datos mostraron que la prevalencia de la enfermedad en la población argentina es 1/125.000. Hasta la fecha, todos los trabajos publicados refieren que la mayoría de los pacientes PAI (90%) son portadores latentes durante toda su vida. En nuestro país, de acuerdo a los datos bioquímicos, sólo el 60% son portadores latentes, mientras que el 40% restante desarrollaron alguna vez la sintomatología aguda característica de la enfermedad. Además, la enfermedad es más frecuente en mujeres que en hombres (7:3), debido fundamentalmente al grupo de los PAI sintomáticos (9:1) ya que las mujeres están más expuestas a los factores desencadenantes de los ataques agudos como las dietas, los anticonceptivos, las variaciones hormonales producidas por el embarazo y el ciclo menstrual.

- 391. El Sistema Caliceína-Cinina en hijos de ratas diabéticas.** Gabriela Marina Prendes, S Hope, H Benítez, V Corti, O Catanzaro

*Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. PROSIVAD-CONICET.*

En estudios anteriores encontramos cambios del sistema caliceína-cinina en ratas diabéticas (modelos farmacológicos con streptozotocina). Nuestro objetivo fue estudiar el sistema vasoactivo urinario en hijos de diabéticas tipo II (H-II), caracterizadas con TTOG, y de diabéticas tipo I (H-I), evaluadas por glucemia basal y tratadas con insulina. Se emplearon ratas Wistar macho de 45 y 85 días, divididos en tres grupos: controles (C), H-I y H-II. Determinaciones: pesos corporales, glucemias, diuresis, proteinuria, caliceína activa. Los resultados fueron (C, H-II, H-I): 1-diuresis (ml/24 hs): 45 días  $3,70 \pm 0,56$ ,  $6,30 \pm 0,64^*$ ,  $8,10 \pm 1,04$ ; 85 días  $7,82 \pm 0,30$ ,  $10,60 \pm 0,10^*$ ,  $6,10 \pm 1,02$ . 2-caliceínas activas (mmoles PNA/min): 45 días  $1,17 \pm 0,11$ ,  $1,46 \pm 0,15$ ,  $3,42 \pm 0,55^*$ ; 85 días  $4,50 \pm 0,16$ ,  $5,20 \pm 0,85$ ,  $4,88 \pm 0,96$  (\* $p < 0,05$  significativo). Conclusión: se observa mayor actividad de caliceínas en H-I a los 45 días.

**392. Porfiria Cutánea Tardía: Detección de la mutación más frecuente en Argentina por PCR-SSCP. Identificación de dos mutaciones nuevas y dos de porfiria hepatoeritropoyética.** Manuel Mendez, MV Rossetti, A De Siervi, A Batlle, V Parera

*CIPYP, FCEyN-UBA-CONICET, Buenos Aires*

La uroporfirinógeno decarboxilasa (URO-D) cataliza la conversión del uroporfirinógeno en coproporfirinógeno. La disminución en su actividad es el defecto primario responsable de dos porfirias genéticas: la porfiria cutánea tardía familiar (PCT-F) y la porfiria hepatoeritropoyética (PHE). En Argentina la mutación g10insA o 30insA en el exón 1 es la más frecuente; por esta razón optimizamos su detección mediante SSCP. Se amplificó un fragmento del gen de 118pb que contenía al exón 1 que en las condiciones de electroforesis a 4°C en geles sin glicerol permitieron su fácil detección. Se realizó el análisis por PCR-SSCP en 5 pacientes PCT-F, detectándose la mutación g10insA en uno de ellos. En una segunda etapa, el gen completo se amplificó en 5 productos de alrededor de 1000 pb, que se secuenciaron por PCR. Se identificaron dos mutaciones nuevas: en un paciente se detectó la mutación W159X y en otro se observó la transversión G a C en la última base del intrón 9, en el sitio aceptor de splicing. En los pacientes restantes se detectaron mutaciones missense: en un caso, la mutación P62L y en el otro A80G, ambas en estado heterocigota. Estas dos mutaciones habían sido descriptas previamente en estado homocigota en pacientes con PHE. Con estos resultados suman 26 las mutaciones identificadas en la URO-D de las cuales 3 pueden causar PHE y PCT.

**393 Factores secretados durante la diferenciación de 3T3L1 a adipocitos modifican la adhesión celular.** Cynthia Zizola, G Bertolesi, María Eugenia Sanchez Ruiz, Marcela Sandoval, Carla Molinari, JC Calvo

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

Previamente presentamos que, durante la diferenciación in vitro de preadipocitos 3T3L1 a adipocitos, aumenta un proteoglicano de condroitín sulfato en el medio de cultivo. Utilizando células 3T3L1 control (C) o en etapa temprana de diferenciación (D), estudiamos su adhesión a los 15 min, a 37 °C, sobre placas de plástico pretratadas con: medio de cultivo fresco (M), medio condicionado de cultivos C (MC) o D (MD), todos conteniendo 10% SFB. Los resultados, expresados como % de células adheridas respecto del total sembrado  $\pm$  DS, para corregir por diferencias en la siembra, muestran, para ambos tipos celulares, una disminución muy significativa de la adhesión al utilizar como sustrato MD. C: (M: 79,80 $\pm$ 9,33; MC: 71,26 $\pm$ 3,35; MD: 28,85 $\pm$ 1,82). D: (M: 59,08 $\pm$ 13,66; MC: 62,14 $\pm$ 2,37; MD: 24,23 $\pm$ 3,22). Si los medios condicionados son digeridos con condroitinasa ABC, se revierte el efecto inhibitorio de MD en un 50% ( $p < 0.001$  respecto de MD sin tratamiento enzimático). C: (MC: 70,64 $\pm$ 5,70; MD: 50,95 $\pm$ 1,22); D: (MC: 60,78 $\pm$ 5,18; MD: 43,34 $\pm$ 4,84). No se observa el mismo efecto luego de digestión con hialuronidasa. **Conclusiones:** Las células 3T3L1 secretan, durante su diferenciación in vitro, factores que disminuyen su adhesión, independientemente de su estado madurativo, entre los cuales se encuentra el condroitín sulfato.

**394. Caracterización de LDL densa (LDL-H).** Verónica Fasulo, S Sanguinetti, R Wikinski, L Schreier

*Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Facultad Farmacia y Bioquímica UBA*

LDL densa es un subtipo de LDL con mayor aterogenicidad. Con el fin de caracterizar esta fracción aislamos por ultracentrifugación del plasma de 15 sujetos, LDL-H ( $d=1.048-1.063$  g/ml) y LDL liviana (LDL-L) ( $d=1.020-1.048$  g/ml). En cada fracción se determinaron colesterol (Col), triglicéridos (TG), fosfolípidos (FL),

proteínas (P) y los cocientes Col/P, TG/P, Col/FL y Col/TG para seleccionar a través del trazado de curva ROC (receptor-operador), el indicador con mejor valor predictivo positivo (VP). LDL-H presentó menos Col que LDL-L expresado como % P/P, (media  $\pm$  ES) 37 $\pm$ 1.5 vs 45 $\pm$ 1.5%,  $p < 0.01$ . Comparados los cocientes en LDL-H vs LDL-L: Col/P fue menor en LDL-H (1,11 $\pm$ 0.05 vs 1.67 $\pm$ 0.18,  $p < 0.01$ ); Col/FL fue menor en LDL-H (1.94 $\pm$ 0.19 vs 3.23 $\pm$ 0.38,  $p < 0.01$ ); TG/P y Col/TG no difirieron (0.28 $\pm$ 0.04 vs 0.37 $\pm$ 0.03 y 5.0 $\pm$ 0.7 vs 5.7 $\pm$ 0.6, respectivamente). La curva ROC demostró que los indicadores con mayor VP fueron Col % (VP=84%, con valor de corte=40%) y Col/P (VP=78%, con valor de corte=1.25). LDL-H contiene menos colesterol que LDL-L con respecto a su contenido proteico.

**395. Efecto del envejecimiento sobre la fosforilación oxidativa y el estrés oxidativo en mitocondrias de hígado y corazón de rata.** Lidia E Costa, Gabriela Méndez, Susana Llesuy, A Boveris

*Instituto de Investigaciones Cardiológicas y Laboratorio de Radicales Libres, Facultad de Medicina y de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires*

La hipótesis de los radicales libres en el envejecimiento postula que la acumulación de daño infligido al DNA mitocondrial por oxirradicales generados en su estrecha vecindad comprometería la función bioenergética. Respiración y fosforilación oxidativa e indicadores de estrés oxidativo fueron medidos en mitocondrias de hígado (RLM) y de corazón (RHM) de ratas hembras Wistar jóvenes (J: 5 meses), maduras (M: 15) y seniles (S: 22). Las velocidades de consumo de O<sub>2</sub> en estado 3 (respiración máxima) y 4 (respiración en reposo), el control respiratorio (CR) y la relación P/O total y neta, determinados por respirometría de alta resolución en mitocondrias altamente acopladas (CR: 6-8), fueron similares en todos los grupos. La actividad de la superóxido dismutasa y el contenido relativo de hidroperóxidos mostraron una tendencia a disminuir con la edad. La quimioluminiscencia iniciada por hidroperóxido (BOOH-CL, cpm/ $\mu$ g prot) determinada en RLM se redujo significativamente en el envejecimiento (J: 32.5 $\pm$ 1.8; M: 25.1 $\pm$ 1.5; S: 17.0 $\pm$ 2.1), consistentemente con un aumento de la vitamina E, probablemente por acumulación de la derivada de la dieta. La ausencia de disminución en la función mitocondrial es consistente con el bajo estrés oxidativo hallado en las ratas seniles.

## POSTERS III

### INMUNOLOGIA BASICA Y CLINICA

**396. Participación del sistema mononuclear fagocítico (SMF) en el clearance de bacterias gram negativas (*Escherichia coli* O111B:4).** P Miliani de Marval, S Gómez, R Meiss, N van Rooijen, M Isturiz, M Palermo

*Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Faculty of Medicine, Vrije Universiteit, Amsterdam*

Se evaluó el papel del SMF en el clearance de *E. coli* (E) en ausencia o presencia de anticuerpos específicos (EA), en ratones BALB/c controles o deplecionados de macrófagos (M $\emptyset$ ) hepáticos y esplénicos por tratamiento e.v. con diclorometilendifosfonato encapsulado en liposomas (Cl<sub>2</sub>MDP). Los ratones tratados con Cl<sub>2</sub>MDP e inoculados con E, sufrieron una disminución en la velocidad de clearance medida como % en sangre a las 3 hs: E: 14 $\pm$ 4; Cl<sub>2</sub>MDP+E: 42 $\pm$ 5;  $p < 0.05$ . Sin embargo, en los ratones inoculados con EA el Cl<sub>2</sub>MDP no indujo modificaciones en el clearance: EA:10 $\pm$ 3; Cl<sub>2</sub>MDP+EA: 18 $\pm$ 4. En ambos grupos, E o EA, la eliminación de M $\emptyset$  produjo un significativo aumento en el

% de bacterias en pulmón respecto a los controles: E:9±1, Cl<sub>2</sub>MDP+E: 22±3; EA: 21±2, Cl<sub>2</sub>MDP+EA: 53±2, n=3; p<0.0003. Esto se correlaciona con una mayor afluencia de PMN al pulmón, evaluada por histopatología, y cuantificación de mieloperoxidasa. Por otra parte, a altas concentraciones de EA, se observa una mortalidad superior al 50% antes de las 3 hs., fenómeno que se revierte por la eliminación *in vivo* de los MØ. Concluimos que la captación en pulmón estaría asociada a la presencia de PMN. Mientras que los MØ estarían involucrados en la muerte temprana observada con EA.

**397. Efecto de la deferoxamina en un modelo murino de shock séptico.** Marisa Vulcano, RP Meiss, MAIsturiz.

*Instituto de Investigaciones Hematológicas, Instituto de Estudios Oncológicos, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires*

Los intermediarios reactivos del oxígeno (IRO), liberados durante los procesos endotóxicos, contribuyen a los cambios fisiopatológicos observados en los cuadros sépticos. En este trabajo se estudió el efecto de la deferoxamina (DFX), una droga quelante de hierro y capaz de actuar como un secuestrador de IRO, en un modelo murino de shock séptico. Los estudios realizados *in vivo* demostraron que la inoculación i.p. de 0.1 ml de DFX (0.1M) disminuye los niveles séricos de TNF- $\alpha$  inducidos por LPS (5 $\mu$ g), (LPS: 1120±146 U/ml; DFX/LPS: 386±171 U/ml, n=6, p<0.001). Por otro lado, la DFX disminuye los índices de mortalidad en ratones inoculados con dosis letales de LPS (200 $\mu$ g), (% mortalidad: LPS: 83.3; DFX/LPS: 16.7, n=6, p<0.001) como así también en animales sensibilizados con D(+)-galactosamina (GalN) que recibieron bajas dosis TNF- $\alpha$  (0.1 $\mu$ g); (GalN-TNF- $\alpha$ : 71.4; DFX/GalN-TNF- $\alpha$ : 14.3, n=7, p<0.001). Esta acción de la DFX se correlaciona con una disminución en el daño tisular observado en pulmón, hígado y riñón ocasionado por la inoculación de LPS, TNF- $\alpha$  o IL-1 $\beta$ . Estos resultados permiten considerar el uso de la DFX como una herramienta complementaria en el tratamiento clínico del shock séptico.

**398. Efecto de la aminoguanidina sobre la infección ocular herpética en ratones Balb/c.** Fabián Benencia, MC Courrèges, EJ Massouh

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

En este trabajo se investigó el efecto de la aminoguanidina (AMG), un inhibidor de la producción de óxido nítrico, en ratones Balb/c infectados ocularmente con herpesvirus (HSV). Grupos de 10 animales inoculados con HSV-1 cepa F fueron tratados diariamente en forma tópica con 2, 4 y 8 mg/ml de AMG los tres días siguientes a la infección. Se registró agravamiento de la enfermedad (día 3 post-infección [pi]), controles: 20% de enfermos, tratados: 60% de enfermos, p<0.05) y aumento de la mortalidad (día 9 pi; control: 0%; 8 y 4 mg/ml AMG: 40%, p<0.01) en los animales tratados. Pudo observarse un aumento de los títulos de virus en lavados oculares de animales tratados (día 1 pi: control = 0; 8 mg/ml AMG = 550 ± 35; 4 mg/ml = 48 ± 10 y 2 mg/ml = 35 ± 4 ufp/ml, p<0.05; día 2: control: 0; 8 mg/ml = 1450 ± 30; 4 mg/ml = 60 ± 9; 2 mg/ml = 50 ± 10 ufp/ml, p<0.05). Se obtuvieron resultados similares en animales infectados con HSV-2 cepa G (día 9 pi, controles: 50% de enfermos, 4 mg/ml AMG: 80% enfermos, p<0.01, 2 mg/ml: 65% de enfermos, p<0.05). En ambos casos se registró variación en el título de anticuerpos neutralizantes en suero de animales tratados (HSV-1, día 20 pi: control = 30 ± 10 unidades neutralizantes [UN]; 8 mg/ml AMG = 140 ± 18 UN; 4 mg/ml = 72 ± 12 UN, p<0.05; HSV-2: control 64 ± 14 UN; 4 mg/ml = 135 ± 29 UN, p<0.05) conjuntamente con un aumento en los valores de hipersensibilidad retardada hacia el virus inactivado medidas como hinchazón de la almohadilla plantar (HSV-1: control = 0.19 ± 0.06 mm; 8 mg/ml AMG = 0.33 ± 0.05 mm; 4 mg/ml = 0.35 ± 0.07 mm, p<0.05). Estos datos indican un papel inhibitorio

del óxido nítrico sobre la replicación viral a nivel de la mucosa ocular en el modelo de queratitis herpética.

**399. Influencia de la tolerancia a lipopolisacáridos en la fisiopatología del síndrome urémico hemolítico.** L Mari, F Alves Rosa, C Rubel, M Palermo, MA Isturiz

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

La tolerancia a lipopolisacáridos bacterianos (LPS) es un fenómeno activo inducido por la inoculación de dosis bajas de LPS, y en el cual la secreción de algunas citoquinas por macrófagos se encuentra inhibida. Por otra parte es conocido que los LPS coadyuvan en la fisiopatología del síndrome urémico hemolítico (SUH) disminuyendo la LD<sub>50</sub> de verocitotoxinas (VT). El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de la tolerancia a LPS en un modelo murino de SUH. Los ratones fueron tolerizados con una dosis diaria i.p. de 2  $\mu$ g de LPS de *E.coli* O111:B4 durante 4 días. Para ello, grupos de 11 ratones BALB/c fueron inoculados con: a) Dosis subletales de VT tipo 2 (VT<sub>2</sub>); b) Dosis subletales de VT<sub>2</sub> + 5 $\mu$ g de LPS; c) Dosis subletales de VT<sub>2</sub> + 5  $\mu$ g de LPS en animales tolerantes a LPS, d) Dosis letales de VT<sub>2</sub> (2 LD<sub>50</sub>) + 5 $\mu$ g de LPS, e) 2 LD<sub>50</sub> de VT<sub>2</sub> + 5 $\mu$ g de LPS en animales tolerantes. Los resultados, expresados como porcentajes de sobrevida, fueron los siguientes: a): 91%; b): 9%; c): 91%; d): 0%, e): 0% (a y c vs. b, p<0.0001; d vs. e, NS) No hubo mortalidad en animales controles, tratados con LPS ni efectos de tolerancia a VT<sub>2</sub> inducidos por la misma VT<sub>2</sub>. Los resultados obtenidos permiten concluir que la tolerancia a LPS aumenta la sobrevida en animales tratados con VT<sub>2</sub> y LPS. Este efecto no se observa con dosis letales de VT<sub>2</sub>.

**400. Caracterización de los autoanticuerpos generados por inmunización con el péptido carboxilo terminal de las proteínas ribosomales P de *T. cruzi* (R13).** C Motrán, F Cerbán, H Rivarola, E Vottero de Cima

*Departamento Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas U.N.C.*

La secuencia del péptido sintético R13 (EEEDDDMGFLFD) correspondiente a la región C-terminal de las proteínas ribosomales P de *T. cruzi* es similar a la las proteínas ribosomales P de mamíferos, H13 (EESDDDMGFLFD). La inmunización con R13 conjugado a OVA induce respuesta humoral específica y autorreactiva contra Acs de tejido cardíaco. Además los animales presentan alteraciones electrocardiográficas (ECG). El objetivo de nuestro trabajo fue investigar en ratones inmunizados con R13-OVA si esta inmunización es capaz de producir la ruptura de tolerancia contra el antígeno propio (H13) y generar una población de auto Acs que lo reconozca específicamente y se mantenga en el tiempo. Para ello en este trabajo se analizó en los días 10 y 80 post 3<sup>o</sup> inmunización: a) la presencia de Acs contra H13, b) la persistencia y avidez (mediante tratamiento con Urea 6M) de los Acs contra R13 y H13; c) los isotipos de Acs que reconocen R13 y H13 y d) la correlación entre los niveles de Acs y el funcionalismo cardíaco. En casi todos los sueros obtenidos en el día 10 post 3<sup>o</sup> inmunización, los niveles de Acs contra R13 fueron mayores que contra H13, mientras que la avidez de ambas poblaciones de Acs fue similar. En los sueros obtenidos en el día 80 post 3<sup>o</sup> inmunización los títulos y avidez de ambos Acs no solo se mantuvieron elevadas sino que se incrementaron mientras que los Acs contra OVA declinaron. Además el perfil de isotipos que reconocen H13 (IgG2>>IgG1=IgG3) fue diferente al que reconoce R13 (IgG1>>IgG2>IgG3) y semejante al detectado para el auto Ag cardíaco. Las alteraciones ECG registradas en el día 80 fueron semejantes a las detectadas en el día 10 post 3<sup>o</sup> inmunización. Nuestros resultados sugieren que la inmunización con R13 induce ruptura de tolerancia al auto Ag generando una población de auto Acs reactivos con H13 probablemente involucrada en el daño funcional al miocardio.

- 401. Factores involucrados en el desarrollo de líneas linfocitarias B obtenidas por cultivo prolongado de células mononucleares periféricas (CMP) de pacientes HIV+.** Beatriz Ruibal-Ares, Lilliana Belmonte, Graciela Méndez, Marta Felippo, R Dourisboure, M Scolnik, Fernanda Palacios, María ME de Bracco

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

Se analizó la influencia de la infección con el virus Epstein-Barr (EBV), la activación celular y la replicación de HIV en el cultivo, en la immortalización de las linfocitos B (LB) a partir de cultivos primarios de CMP HIV+. Para ello se estudió: 1) la expresión de la proteína de latencia de EBV LMP1 (citometría); 2) el rearreglo de cadenas H de Ig (PCR) o restricción de cadenas  $\Lambda$  o K (citometría); 3) la expresión de CD38, CD30 y CD40 (citometría); 4) la liberación de HIV-p24 al sobrenadante (SN) (ELISA), desde los días 7 a 60 de cultivo. Se demostró que en líneas obtenidas en distintas tomas de un mismo paciente, los rearreglos de cadena H y la cadena liviana eran diferentes. Antes de la immortalización (9-23 días), tanto los cultivos que originaron líneas B a los 40 días (CFL, n=27) como los que no lo hicieron (CNFL, n=24) eran LMP1+. Inicialmente, la proporción de células CD20+, CD38+ fue similar en cultivos de CMP HIV- y CMP HIV+ (2.47-2.55%). A los 30 días este valor creció en CFL (4.30-5.0 %). La intensidad de CD38 fue mayor en CFL que en CNFL ( $>10^3$  vs  $<10^3$  i.i.). La expresión de CD40 y CD30 fue alta tanto en CFL, como en CNFL, pero el número de LB CD40+, CD30+ en apoptosis, crecía a partir del día 15 en CNFL (10-15 %), y disminuía (0.1-1%) en CNFL. En los CMP HIV+, hubo replicación de HIV (p24: 80 -  $>1500$  pg/ml) entre los días 10-30. En el 50 % de LB immortalizados ( $>60$  días) persistió replicación de HIV (30-50 pg/ml). Estos resultados indican que: la infección por EBV no es suficiente para la immortalización de LB; las líneas pueden generarse a partir de distintos clones EBV+; la replicación de HIV, la activación celular (CD38+) y la persistencia de CD30+, CD40+ contribuyen a la immortalización de LB EBV+.

- 402. Análisis comparativo de la respuesta inmune murina a la infección por *Brucella* y a la inmunización con proteína de 18 kDa (p18) en distintos sistemas de inmunización.** C Velikovskiy<sup>1</sup>, J Cassataro<sup>2</sup>, P Baldi<sup>1</sup>, G Giambartolomei<sup>1</sup>, F Goldbaum<sup>1</sup>, M Spitz<sup>2</sup>, CA Fossati<sup>1</sup>

*IDEHU, FFyB, UBA<sup>1</sup> y Laboratorio Inmunogenética, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, UBA<sup>2</sup>.*

Para evaluar la inmunogenicidad de la p18 de *Brucella* y compararla con la respuesta (rt) inducida en la infección, se infectaron ratones BALB/c con distintas especies de *Brucella* y se ensayaron distintos planes de inmunización con p18 soluble (p18s) y con sin adyuvante de Freund Incompleto (AFI), p18 insoluble (p18i) sin AFI y con un plásmido codificante para p18. Todas las infecciones e inmunizaciones produjeron una buena rt humoral, aun la p18 soluble sin AFI. Se generaron anticuerpos (Ac) IgM y todos los isotipos de IgG, con diferencias en sus niveles y cinética de evolución. AFI aumentó 1000 veces la rt, con preponderancia de IgG1. En contraste, con DNA la rt fue menor pero con preponderancia de IgG2, sin IgM ni IgG3. En todas las inmunizaciones se generó rt celular para p18, medida por proliferación. En las infecciones la rt humoral fue mayor, con predominio de IgG2a, y hubo proliferación celular. Estos resultados sugieren que la vacunación con proteína induce una respuesta Th2 mientras que el DNA desnudo produce una respuesta predominantemente Th1 similar a la de las infecciones.

- 403. Funcionalidad de macrófagos y autoanticuerpos antisulfocerebrósidos (AcS) en ratas con infección aguda por *Trypanosoma cruzi*, nacidas de madres tratadas con interferón gamma recombinante (IFN- $\gamma$ ) durante la preñez.** G Dídoli, H Dávila, S Feldman, S Revelli, O Bottasso

*Instituto de Inmunología y Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas, UNR, Rosario.*

El IFN- $\gamma$  dado a ratas preñadas, infectadas o no con *T. cruzi*, atenúa la infección homóloga de sus crías. Dado que el IFN- $\gamma$  activa a los macrófagos pero puede favorecer la autoreactividad, se estudió la funcionalidad de los macrófagos peritoneales (MP) infectados in vitro con *T. cruzi*, y los niveles de AcS de 4 grupos de crías infectadas con *T. cruzi* (n=5, c/u) nacidas de madres, infectadas con  $10^6$  *T. cruzi* a los 7, 14, y 21 días del apareamiento (Tc); Tc más 15 días de tratamiento con IFN- $\gamma$  desde el día 2 de apareadas 50.000 UI/rata/día (TcIF); igual tratamiento pero no infectada (IF); sin intervenciones (Co). Los MP (día 7 pi) se expusieron a una relación parásito-célula 10:1. Se observó (media  $\pm$ es): % cél. fagocíticas Tc  $18 \pm 2.2$ , TcIF  $20.2 \pm 3.2$ , IF  $22.7 \pm 2.4$ , Co  $16.7 \pm 9.6$ , crías no infectadas (NI)  $31.7 \pm 10.5$ . Parásitos/100 cél. (incubac. 18 hs) Tc  $42 \pm 10.5$ , TcIF  $19 \pm 6.3$ , IF  $21.2 \pm 5.3$ , Co  $63.2 \pm 21$ , NI  $84.5 \pm 26$  (p<0.05). NO<sub>2</sub> sobrenadante 42hs (nmoles /  $10^6$  cél.) Tc  $107 \pm 18$ , TcIF  $75 \pm 7$ , IF  $93 \pm 20$ , Co  $107 \pm 15$ , NI  $34 \pm 6$  (p<0.03). Los niveles de AcS (día 30 pi) fueron Tc  $0.93 \pm 0.04$  (DO), TcIF  $0.91 \pm 0.03$ , IF  $1.08 \pm 0.04$ , Co  $1.20 \pm 0.03$ , NI  $0.90 \pm 0.04$  (p<0.001). Las crías de IF y TcIF tienen MP menos permisivos a la infección in vitro, sin exacerbar los niveles de AcS.

- 404. Diferente reactividad de anticuerpos órgano-específicos en sueros de ratones infectados con el virus elevador de la lactato deshidrogenasa (LDV) y con el virus de la hepatitis murina (MHV)** Patricia A Mathieu\*, Karina. Gómez\*, J-P Coutelier#, Lilia A Retegui\*

*\*IQUIFIB (UBA-CONICET). Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. #Instituto Internacional de Patología Celular. Bruselas. Bélgica.*

Hemos detectado anticuerpos (Ab) órgano-específicos en ratones CBA/HI infectados con LDV. Todos los animales desarrollaron Ab contra varios antígenos (Ag) tisulares a partir de la segunda semana postinfección, aunque el patrón de respuesta fue diferente para cada individuo. Ensayos de Western-Blot permitieron establecer que estos Ab reconocían epítopos crípticos, y que no serían polireactivos. Por el contrario, los sueros de ratones CBA/HI, BALB/c y 129/Sv infectados con MHV reaccionaron con un único Ag presente en hígado, cuyo PM es de aproximadamente 40.000; esta proteína ya ha sido parcialmente purificada utilizando tamices moleculares y cromatografía de intercambio iónico. Los resultados obtenidos indican que el LDV induce autoanticuerpos que reconocen una gran variedad de Ag tisulares sólo en ratones susceptibles, mientras que la infección con MHV origina Ab dirigidos contra un Ag específico de su órgano blanco, independientemente de la cepa de ratones utilizada.

- 405. Desarrollo de vectores adenovirales para la transferencia génica de IL-1 y VEGF.** Federico Prada, N Muraro, N Di Paolo, O Podhajcer, F Pitossi.

*IIB-Fundación Campomar. UBA-CONICET*

La terapia génica consiste en transferir material genético *in vivo* o *ex-vivo* para reemplazar o suplementar genes defectuosos mediante distintas estrategias. La transferencia génica puede realizarse utilizando vectores virales o no virales. Los vectores de origen adenoviral (adenovirus tipo 5) poseen un genoma doble cadena de 36kb al que se le han delecionado los genes E1, imprescindibles para la replicación viral. La incorporación de hasta 8 kb de material, la habilidad de infectar innumerables tipos celulares incluyendo estadios postmitóticos y la bioseguridad del producto terminado convierten a los adenovectores en una herramienta clave para la transferencia de genes. Se han desarrollado, entre otros, dos vectores adenovirales que expresan en forma constitutiva IL-1 y VEGF, en las poblaciones celulares blanco. Estos adenovirus se utilizarán para transducir células *in vitro* e *in vivo* en diferentes modelos de cáncer y neurodegeneración. Ambos vectores se generaron a partir de un plásmido que contiene en lugar del gen E1, el promotor del virus del sarcoma de Rous, un

sitio de clonado múltiple (donde se insertó el ADNc de IL-1 y VEGF) y la señal de poliadenilación derivada del SV40, gentilmente provisto por H Victor Perry (Oxford, G.B.). Este plásmido se cotransfectó a células 293 (que transcomplementan E1) junto a un fragmento del Ad5 que carece de los genes E1 y E3 (Ad dl327). Por recombinación homóloga se obtuvieron los adenovirus recombinantes. Se extrajo el ADN viral mediante la técnica de Hirt y se chequeó el sitio de integración por restricción y Southern Blot. La expresión del ARNm fue determinada por Northern Blot. Los adenovirus se purificaron por ensayos de placa bajo agar y se amplificaron en células 293 hasta lograr un stock viral de  $10^{11}$  unidades formadoras de placa/ml. Se verificó por PCR la ausencia de la secuencia E1 en los vectores recombinantes y la transducción de células no transcomplementadoras de la región E1. El alcance y las perspectivas de la aplicación de esta nueva técnica serán discutidos.

**406. La glutamato dehidrogenasa del *T. cruzi* induce, durante la fase aguda de la infección, anticuerpos de tipo IgM y no es capaz de generar memoria inmunológica en pacientes con enfermedad de chagas. E Zúñiga, C Montes, G Barbieri\*, A Gruppi**

*Inmunología, Facultad de Ciencias Químicas, UNC, Córdoba; \* Centro de Chagas y Patología Regional, Santiago del Estero.*

Hemos descripto que sueros de pacientes con Chagas agudo presentan anticuerpos (Acs) de tipo IgM y muy bajos niveles de IgG anti FI, una fracción antigénica alcalina obtenida del citosol de epimastigotes del *T. cruzi*. Estos Acs se encuentran ausentes en pacientes que cursan el período crónico de la enfermedad. A los fines de identificar la/las proteínas reconocidas por la IgM, FI fue separada por SDS-PAGE, y por inmunoblott se observó que la IgM reconoce en FI 2 o 3 bandas con PM de 67, 47 y 42 kDa. Por Coomassie brilliant blue observamos, en FI, alrededor de 8 proteínas con PM entre 80 y 25 kDa, siendo la banda de 47 kDa una de las más relevantes en concentración. Esta banda fue sometida a un análisis de secuencia de aa. Los resultados obtenidos indican que esta proteína comparte homología con una proteína descrita previamente por Cazzulo et al (1988): la glutamato dehidrogenasa (GDH) del *T. cruzi*. La proteína de 47 kDa fue obtenida por electroelución del gel de SDS-PAGE y al igual que con FI, ensayada por Elisa, fue reconocida solamente por los sueros de los pacientes con Chagas agudo. Los resultados obtenidos indican que antígenos alcalinos del *T. cruzi*, como la GDH, son capaces de inducir Acs IgM en el período agudo de la infección y que esta respuesta desaparece con el curso de la enfermedad.

**407. Antígenos alcalinos del *T. cruzi* estimulan la proliferación de células B normales de modo T-independiente. Identificación de una proteína de 25 kDa responsable de la actividad biológica. CL Montes, E Zúñiga, C Arce, E Votterocima, A Gruppi**

*Inmunología, Facultad de Ciencias Químicas UNC, Córdoba*

Hemos descripto que FI, una fracción antigénica de pl 7-9 obtenida del citosol de epimastigotes de *T. cruzi*, estimula la proliferación y diferenciación de linfocitos (Li) B murinos normales en células secretantes de Acs polireactivos vía complejo BCR. Para profundizar en el estudio de los mecanismos comprometidos en este fenómeno estudiamos la participación de células accesorias (CA) y de LiT. Observamos que células mononucleares de bazo normales (CMBN) depletadas de CA, por tratamiento con leucil metil ester, e incubadas con FI no fueron capaces de proliferar, indicando que las CA son indispensables para la estimulación. La presencia de Acs anti-CD40L en cultivos de CMBN estimuladas con FI no modificó los niveles de linfoproliferación indicando que la interacción CD40-CD40L no participa en este fenómeno. Las CMBN estimuladas con FI presentan un 10% de Li CD3+CD25+ vs un 13% en CMBN sin estímulo. CMBN estimula-

das con Con A presentaron un 85 % de Li CD3+CD25+. Previamente demostramos que FI no es capaz de estimular la proliferación de LiT ni la producción de IL2. Estos datos indican que los LiT no participan en la inducción de activación policlónica de LiB por FI. A los fines de identificar el/los componentes de FI responsables de la actividad biológica, FI se separó de acuerdo a su PM (Superosa 12). La capacidad linfoproliferativa se detectó en fracciones que contenían una banda de 25 kDa. Esta proteína electroeluida a partir de un SDS-PAGE demostró poseer la actividad biológica observada en FI.

**408. Inducción de neutrofilia por Verocitotoxina-2 (VT<sub>2</sub>). Implicancias en el síndrome urémico hemolítico (SUH). GC Fernández, G Dran, C Rubel, MA Isturiz, MS Palermo**

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

En el SUH la neutrofilia es un parámetro de mal pronóstico. Nuestro objetivo fue analizar en un modelo murino los efectos de la VT<sub>2</sub> sobre las poblaciones leucocitarias. Para ello se inyectó salina estéril o VT<sub>2</sub> libre de LPS en ratones BALB/c en dosis letales dentro de las 96 hs. Se sangró en forma diaria y se cuantificó el porcentaje de PMN por citometría. Se observó un aumento progresivo en el % de PMN en los animales tratados a las 72 hs.: Salina: 34±2, VT<sub>2</sub>: 70±4; n=12, p<0.0001. También está aumentado el número absoluto de PMN por mm<sup>3</sup>: Salina: 4300±600, VT<sub>2</sub>: 12300±1000; n=12 p<0.0001. Paralelamente se observó aumento en la expresión del CD11b, marcador de activación de los PMN (IF: Salina: 938±56, VT<sub>2</sub>: 1135±18; p<0.01). Considerando que el LPS es un agente coadyuvante de la toxicidad por VT<sub>2</sub>, se analizaron los mismos parámetros en animales inyectados con LPS y VT<sub>2</sub>. Dicho tratamiento provoca una disminución en la sobrevida y un aumento mayor en los PMN (LPS+VT<sub>2</sub> 72 hs.: 81±5; n=5). Se encontró una marcada correlación entre la uremia (indicador del daño renal) y el % de PMN (r=0.83, p<0.001). Para determinar la procedencia de los PMN se midió el CD11b en médula ósea encontrándose disminuido: Salina: 20±1, VT<sub>2</sub>: 10±2; p<0.05. Conclusión: La VT<sub>2</sub> induce una marcada neutrofilia que está estrechamente asociada al daño renal. La activación de los PMN podría jugar un papel relevante en la fisiopatología del SUH.

**409. Parámetros inmunológicos en triquinosis durante la preñez. G Núñez, T Gentile, S Venturiello**

*IDEHU (CONICET-UBA), Buenos Aires*

Diferentes parámetros inmunológicos relacionados con el mecanismo de ataque parasitario en triquinosis fueron estudiados en ratas preñadas a diferentes tiempos post-infestación y comparados con los obtenidos en ratas vírgenes parasitadas. Los niveles séricos de IgE total se determinaron por ELISA y los de IgE e IgG/M específica para el estadio parasitario de larva recién nacida (LRN), por IFI. El grado de mortalidad parasitaria inducida por los sueros se estudió mediante ensayos in vitro de CCDA y la carga parasitaria por digestión péptica de tejido muscular. Los resultados obtenidos en ratas infestadas preñadas y vírgenes muestran que: a) El nivel de IgE sérica total fue mayor en ratas preñadas que en las ratas vírgenes (14.7 ± 3.2 µg/ml y 9.4 ± 3.3 µg/ml respectivamente). b) Acs IgM/G anti-LRN se detectan con anterioridad en ratas preñadas, no observándose diferencias en el tiempo de aparición de IgE específica. c) La carga parasitaria de ratas preñadas fue significativamente inferior. d) No hubo diferencias significativas en el grado de mortalidad parasitaria mediada por los sueros (44 ± 10%), independientemente del nivel de IgE específica. e) En las crías se detectó la presencia de larvas musculares. Estos resultados sugieren una importante actividad helmintocitotóxica en la preñez independiente de la presencia de IgE específica; a pesar de ello, existe pasaje transplacentario de parásitos.

**410. Alteraciones tímicas y producción de factor necrótico tumoral e interleukina 1β, en dos cepas de ratones con infección aguda con *Trypanosoma cruzi* de distinta**

**morbilidad.** E Roggero, E Serra, S Revelli, E Piaggio, J Wietzerbin, OA Bottasso

*Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, PROMUBIE-CONICET, Facultad de Ciencias Bioquímicas Farmacéuticas de Rosario; Institut Curie, París*

Estudios histológicos en la infección aguda experimental con *T. cruzi* en ratones C57Bl/6 y Balb/c muestran pérdida progresiva y sustancial de la celularidad en corteza tímica, asociada a la presencia de cuerpos apoptóticos. En la cepa C57Bl/6 se observa caquexia y muerte, mientras que la Balb/c se recupera de la fase aguda, normalizando el peso (30-40 días pi) y parte de la arquitectura tímica. Dada la actividad pro-inflamatoria de la IL-1 $\beta$ , y la capacidad del FNT- $\alpha$  para inducir apoptosis en timocitos, se investigaron los niveles séricos de FNT- $\alpha$ , e IL-1 $\beta$ , y el grado de fragmentación del ADN en células tímicas. Ambas citoquinas comenzaron a ser detectables a partir del día 7 pi alcanzando valores máximos al día 21 pi, los cuales fueron (media $\pm$ es) C57Bl/6: IL-1 $\beta$  124 $\pm$ 38, FNT- $\alpha$  705 $\pm$ 172; Balb/c IL-1 $\beta$  93.5 $\pm$ 18, FNT- $\alpha$  413 $\pm$ 68 (p<0.05). El análisis por electroforesis en geles de agarosa mostró fragmentación del ADN genómico obtenido de timos de ratones al día 21 pi. La pérdida de celularidad de la corteza tímica está vinculada a apoptosis y en la cepa donde el proceso es irreversible ello se asocia con niveles más aumentados de FNT- $\alpha$ .

**411. Patrón de citoquinas en linfocitos B inmortalizados luego del cultivo prolongado de células mononucleares periféricas (CMP) de pacientes HIV+.** Liliana Belmonte, Marta Felippo, Graciela Méndez, Carolina Bayo-Hanza, María ME de Bracco, Beatriz Ruibal-Ares.

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

Se ha señalado el papel de la IL-10, ya sea la de origen viral (vIL-10) o la de los propios linfocitos B (LB), en la inmortalización de LB positivos para el virus de Epstein-Barr (EBV). En este trabajo estudiamos el patrón de citoquinas secretadas al medio sobrenadante (SN) en 9 líneas celulares continuas LB, EBV+, obtenidas a partir del cultivo prolongado de CMP de pacientes HIV+. Se midió por ELISA la concentración de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF $\alpha$  y GM-CSF, y se estudió por citometría la presencia de IL-10 citoplasmática. No fue posible demostrar IL-4 ni GM-CSF en ningún caso. En 4 líneas celulares se detectó IL-2 (X $\pm$ ES:30 $\pm$ 12 pg/ml). TNF $\alpha$  fue positivo en 5/5 líneas estudiadas (70 $\pm$ 9 pg/ml); IL-6 fue detectable en 7/9 líneas con valores variables de 9-130 pg/ml (X $\pm$ :70 $\pm$ 26 pg/ml). Si bien IL-10 fue positiva en todas las líneas (9/9) los valores oscilaron entre 20 y 2500 pg/ml (X $\pm$ ES: 495 $\pm$ 263 pg/ml). Hubo coincidencia entre la magnitud de IL-10 en el SN y la detección de IL-10 citoplasmática. En dos pacientes que desarrollaron líneas continuas después de 40 días, se pudo evaluar IL-6 e IL-10 antes de la inmortalización de LB. En ellos, los valores de IL-6 e IL-10 fueron elevados tanto a los 7 (IL-6>250 pg/ml; IL-10: 500-200 pg/ml) como a los 14 días de inicio del cultivo primario. Nuestros resultados indican que el patrón de expresión de citoquinas en las diferentes líneas celulares B generadas luego del cultivo prolongado de CMP HIV+ es variable, con predominio de expresión de IL-10, TNF $\alpha$  e IL-6. Estas citoquinas podrían intervenir tanto en la génesis de las líneas LB como en su mantenimiento, cooperando con otros elementos determinantes de transformación como la infección por EBV. Patrón de citoquinas en linfocitos B inmortalizados luego del cultivo prolongado de células mononucleares periféricas de pacientes HIV+. Se ha señalado el papel de la IL-10, ya sea la de origen viral (vIL-10) o la de los propios linfocitos B (LB), en la inmortalización de LB positivos para el virus de Epstein-Barr (EBV). En este trabajo estudiamos el patrón de citoquinas secretadas al medio sobrenadante (SN) en 9 líneas celulares continuas LB, EBV+, obtenidas a partir del cultivo prolongado de CMP de pacientes HIV+. Se midió por ELISA la concentración de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF $\alpha$  y GM-CSF, y se estudió por citometría la presencia de IL-10 citoplasmática. No fue posible demostrar IL-4 ni GM-CSF en ningún caso. En 4 líneas celulares se detectó IL-2 (X $\pm$ ES:30 $\pm$ 12

pg/ml). TNF $\alpha$  fue positivo en 5/5 líneas estudiadas (70 $\pm$ 9 pg/ml); IL-6 fue detectable en 7/9 líneas con valores variables de 9-130 pg/ml (X $\pm$ :70 $\pm$ 26 pg/ml). Si bien IL-10 fue positiva en todas las líneas (9/9) los valores oscilaron entre 20 y 2500 pg/ml (X $\pm$ ES: 495 $\pm$ 263 pg/ml). Hubo coincidencia entre la magnitud de IL-10 en el SN y la detección de IL-10 citoplasmática. En dos pacientes que desarrollaron líneas continuas después de 40 días, se pudo evaluar IL-6 e IL-10 antes de la inmortalización de LB. En ellos, los valores de IL-6 e IL-10 fueron elevados tanto a los 7 (IL-6>250 pg/ml; IL-10: 500-200 pg/ml) como a los 14 días de inicio del cultivo primario. Nuestros resultados indican que el patrón de expresión de citoquinas en las diferentes líneas celulares B generadas luego del cultivo prolongado de CMP HIV+ es variable, con predominio de expresión de IL-10, TNF $\alpha$  e IL-6. Estas citoquinas podrían intervenir tanto en la génesis de las líneas LB como en su mantenimiento, cooperando con otros elementos determinantes de transformación como la infección por EBV.

**412. Efecto de la administración oral de bacterias lácticas en la inducción del ciclo de IgA.** E Vintiñi<sup>2</sup>, S Alvarez<sup>1,2</sup>, M Medina<sup>2</sup>, M Medici<sup>2</sup>, G Perdígón<sup>1,2</sup>

*<sup>1</sup>Instituto de Microbiología, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, UNT., <sup>2</sup>CERELA*

Anteriormente demostramos que algunas bacterias lácticas (BL) incrementan el N° de células IgA en intestino delgado (ID). **Objetivos:** estudiar el efecto de distintos géneros y especies de BL, sobre IgA asociadas a ID y bronquios. Proponer mecanismo de interacción de BL en ID. **Materiales y Métodos:** a) determinación IgA\*, IgM\*, IgG\*, CD4\*, CD8\* en intestino por IFD, b) recuento de otras células inmunes en ID, c) IgA\* asociadas a bronquios, d) en-sayo de fagocitosis, e) Ac. anti-BL en fluido intestinal por ELISA. **Resultados:** a) las BL aumentaron las células IgA\* (V.N=86 $\pm$ 3, BL=100 $\pm$ 5-140 $\pm$ 5), *Lactoc. lactis*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* y *L. rhamnosus* aumentaron IgM (VN=29 $\pm$ 2, BL=60-80 $\pm$ 3). Ninguna BL aumenta IgG\* (VN=45). *L. casei* y *L. plantarum* aumentan CD4\* (VN=54 $\pm$ -BL=80-131 $\pm$ 5) y *L. plantarum* CD8\* (VN=58 $\pm$ 5, BL=107 $\pm$ 8), b) *L. acidophilus*, *L. plantarum* y *L. rhamnosus* aumentan los PMN y mastocitos, c) las BL ensayadas excepto *L. acidophilus* aumentaron IgA\* en bronquios (VN=18 $\pm$ 4, BL=80-90 $\pm$ 5), d) todas estimularon macrófagos (VN=20 $\pm$ 2, BL=37 $\pm$ 1,2-46 $\pm$ 2), e) *L. casei*, *L. rhamnosus*, *S. thermophilus* y *L. plantarum* produjeron Ac. Anti-BL (VN=0,083 $\pm$ 0,042, BL=0,274-0,350 $\pm$ 0,028). **Conclusiones:** Con excepción de *L. acidophilus* las BL indujeron el ciclo de IgA. *L. casei* y *L. plantarum* interactuarían con células M y las restantes a nivel de célula epitelial.

**413. Actividad inhibitoria de lactobacilos sobre la apoptosis de macrófagos inducida por Salmonella.** JC Valdez, M Rachid, N Gobbato, G Perdígón

*Cátedra de Inmunología, Instituto de Microbiología, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, UNT, Tucumán*

*Salmonella thyphimurium* (*S. typh*) causa en ratón una enfermedad similar a la fiebre tifoidea. Invade la célula M y luego a macrófagos de placa de Peyer y de ganglios mesentéricos. Se diseminan por inducción de apoptosis. En estudios previos demostramos que la administración oral de algunas bacterias lácticas (BL) protegen contra la diseminación sistémica de *S. typh*. **Objetivo:** Estudiar in vitro la actividad de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* sobre la apoptosis de macrófagos inducida por *S. typh*. **Material y métodos:** Macrófagos peritoneales (10<sup>6</sup> células/ml) extraídos de ratones Balb/c endocriados se cultivaron en medio RPMI-1640. El cultivo se adicionó con una suspensión de 10<sup>8</sup> *L. bulgaricus*, 10<sup>8</sup> de *S. thermophilus* o de una mezcla de 5x10<sup>5</sup> de *L. bulgaricus* más 5x10<sup>5</sup> de *S. thermophilus*. Las células se infectaron con *S. typh*. (10<sup>7</sup> cel.). Controles: macrófagos incubados con: 1) *L. bulgaricus*, 2) *S. thermophilus*, 3) mezcla de ambos y 4) *S. typh*. Control positivo: macrófagos tratados con DNasa. El % de macrófagos en apoptosis se determinó mediante el método de TUNNEL. **Resultados:** % de apoptosis

obtenida:1) con *S.typh.* 76,6±5,7; con *L.bulgaricus* 4,6±2,5; con *S.termophilus* 6±0; con *L.bulgaricus* ± *S.termophilus* 16,6±5,7. Control positivo:100%. El % de apoptosis en los grupos test fueron: *L.bulgaricus* más *S.typh.* 18,3±5,7; *S.termophilus* más *S.typh.* 40±10; la mezcla de BL más *S.typh.*: 36,6±11,5. **Conclusión:** La infección con *S.typh.* induce en macrófagos un alto % de apoptosis, el cual disminuye notablemente cuando se preincuban con lactobacilos. Estos microorganismos mostraron un % de apoptosis mínimo. Estos resultados se correlacionan con la capacidad preventiva in vivo de estas BL sobre la infección con *S.typh.*, probablemente debido a la acción inmunomoduladora ejercida por los lactobacilos.

**414. Producción de inmunógenos celulares de *Clostridium chauvoei* asociada al ciclo de crecimiento.** María Aída Mattar, TI Cortiñas, AMS de Guzmán

Area de Microbiología, UNSL, San Luis

*Clostridium chauvoei* es el agente etiológico de la mancha, enfermedad que afecta al ganado bovino y ovino con un alto índice de mortalidad. La inmunidad contra esta enfermedad es producida principalmente por componentes de la célula bacteriana. Por tal motivo, nuestro objetivo fue estudiar la producción de antígenos celulares, obtenidos por sonicación, provenientes de cultivos de 6, 12 y 24 h en sistema batch a fin de determinar la presencia de proteínas inmunoprotectoras de dos cepas regionales de *C.chauvoei* (cepas 8 y 17). Se realizaron los perfiles proteicos en SDS-PAGE, la capacidad protectora e inmunogénica fue evaluada por ensayos de protección en ratón y test de ELISA identificándose las bandas inmunoreactivas mediante Western Blot. Se encontraron diferencias en los perfiles proteicos. Se observó una notable disminución de la capacidad protectora de los antígenos de la cepa *C.chauvoei* 17 obtenidos a las 24 h no existiendo diferencias significativas en los niveles de Ig G alcanzados. El hallazgo de una banda inmunoreactiva de 34kDa, presente en todos los cultivos de la cepa 8 y en los cultivos de 6 y 12 h de la cepa 17, asociada a altos niveles de protección, sugiere su participación en la inmunidad protectora y cuya producción está estrechamente relacionada a la fase de crecimiento celular.

**415. Dosaje de IL-4, IL-6 e IFN  $\gamma$  en pacientes internados en una Unidad de Terapia Intensiva (UTI).** P Paradiso\*, O Vargas, L Adan

División Hemoterapia, Hospital Durand, Buenos Aires

Resulta interesante analizar en pacientes internados en UTI, mediante la cuantificación de algunas ILS, el tipo de respuesta inmune que implementan frente a diferentes agentes patógenos. **Objetivos:** Cuantificar IL-6, IL-4 e IFN  $\gamma$  en estos pacientes internados sin diagnóstico previo. **Materiales y Métodos:** Muestras de suero provenientes de 15 pacientes internados en UTI, en el lapso de 2 semanas (8 hombres y 7 mujeres) Edades: entre 22 y 45 años. Se desarrolló serología para HBV, HCV, HIV, HTLV, Chagas, Sífilis y Brucelosis, y cultivos bacterianos. Se determinó la cc de IL-4, IL-6 e IFN  $\gamma$ . **Resultados:** **Pacientes reactivos:** 3/15 pacientes resultaron reactivos para algunas pruebas serológicas anteriormente mencionadas y mostraron IL-4  $\uparrow$ , IL-6  $\uparrow$  y PCR  $\uparrow$ , 2/15 padecían Herpes, con IFN  $\gamma$   $\uparrow$ , IL-6  $\uparrow$  y PCR  $\uparrow$ , 1/15 presentó IL-6  $\uparrow$ , IFN  $\gamma$   $\uparrow$  y PCR  $\uparrow$ , 3/15 sólo mostraron PCR  $\uparrow$  e IL-6  $\uparrow$ , 2/15 tenían IL-4  $\uparrow$ , IL-6  $\uparrow$  y PCR  $\uparrow$  con cultivo positivo. Pacientes no reactivos: 4/15 mostraron pruebas serológicas y cultivos negativos. **CONCLUSIONES:** El título de PCR se correlaciona con la cc de IL-6 en estos pacientes ( $r=0.97$ ). En pacientes infectados por HSV (Herpes) IFN  $\gamma$   $\uparrow$ , IL-6  $\uparrow$  y PCR  $\uparrow$ . Pacientes con infecciones bacterianas incrementan su concentración de IL-4, IL-6 y PCR.

**416. Isotipos IgG1 e IgG2a inducidos en ratones inmunizados con antígenos de *Yersinia enterocolitica* O:8 por vía oral.** Silvia Di Genaro, E Muñoz, C Aguilera Merlo, AM de Guzmán

Area Microbiología, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis

*Yersinia enterocolitica* causa infecciones intestinales. El balance Th1 y Th2 es de interés en el estudio de vacunas contra patógenos de mucosas. Células Th1 estimulan IgG2a, y Th2 IgG1. El objetivo del presente trabajo es definir antígenos de membrana externa (ME) de *Yersinia* que inducen IgG1 e IgG2a en ratones inmunizados por vía oral. La ME fue obtenida por sonicación y tratamiento con Tritón X100 (Michiels y col. 1990). Los ratones (cepa Rockland) recibieron por vía oral 4 dosis semanales de 1 mg de proteína. El día 29 se analizó por ELISA e inmunoblotting la respuesta IgG1 e IgG2a en suero de animales inmunizados y controles. Se obtuvo respuestas significativas de IgG1 e IgG2a específicas ( $p<0.05$ ). Por inmunoblotting se identificó que IgG1 reconoce fuertemente las bandas de 90, 71 y 50 kDa, y que IgG2a reconoce fuertemente la de 30 kDa. Esta última banda se destaca en SDS-PAGE de ME. El PM de esta proteína coincide con el de una porina que ha demostrado inducir IFN  $\gamma$  a altas concentraciones. De los resultados puede concluirse que antígenos de la preparación de ME de *Y. enterocolitica* pueden inducir respuesta Th diferentes.

**417. Perfil de citoquinas de pacientes atópicos versus normales.** A Ginaca\*, L Bezrodnik\*, MI Gaillard\*, J Maspero\*\*, M Kohan\*\*

\*Servicio de Inmunología, \*\*Servicio de Alergia, Hospital de Niños R. Gutiérrez, Bsuenos Aires

Tratando de definir las subpoblaciones LT helper (TH), involucradas en la fisiopatología de las enfermedades atópicas, evaluamos la producción de citoquinas en 10 pacientes atópicos (PA) y 10 controles normales (CN). Se cultivó células mononucleares de sangre periférica, estimuladas con PHA (10ug), durante 2hs., 16hs, 24hs, 36hs, 48hs. Se midió por ELISA la producción de IL2, IL4, IL5, IFN  $\gamma$  en los sobrenadantes. La máxima producción de IL5 se obtuvo entre las 36 y 48hs para PA y CN. La IL2 a las 36hs para PA y 48hs para CN. La del IFN  $\gamma$  fue a las 48hs para ambos. Los PA mostraron mayor producción de IL2 e IL5 (2 a 3 veces) vs. CN. La producción de IFN  $\gamma$  fue de 1,5 a 2 veces mayor que los CN. No se encontró diferencias en nuestro modelo con respecto a la producción de IL4. Este patrón de citoquinas reveló la activación de clones tanto TH2 como TH1 o TH0 en PA evaluados. Nos preguntamos si esto podría corresponder a activación crónica del Sistema Inmune.

**418. Diferente asociación HLA de las formas autolimitadas y prolongadas de la infección por el virus de hepatitis A (vha).** J Larriba, A Roy, C Velasco, M Pando, M Ciocca, M Zelazko, L Fainboim

División Inmunogenética, Hospital de Clínicas y Servicio de Inmunología, Hospital Garrahan, Buenos Aires

El haplotipo HLA-DRB1\*1301 confiere un alto riesgo de padecer la forma pediátrica de autoinmunidad hepática (PAH). El VHA sería el desencadenante de la hepatitis autoinmune (HA) de tipo I. Se estudió la asociación HLA con formas autolimitadas y prolongadas de infección por VHA (anti HAV-IgM+ superior a 12 semanas). Se detectaron por IFA anti-ANA, anti-actina y anti-LKM. Los loci DRB1, DRB3 y DQB1 fueron tipificados por PCR-SSO. Todos presentaban aminotransferasas elevadas, ictericia y hepatomegalia. En 56 pacientes la infección fue autolimitada. La tipificación HLA mostró una asociación significativa con el alelo DRB1\*14 ( $p=0.0009$ ). El 41% (12/29) de los pacientes fue Ac. Anti-actina positivo, independientemente del fenotipo HLA. En las formas prolongadas, todos mantenían enzimas elevadas, 18/21 presentaban hipergamaglobulinemia y 16/21 (76%) de Ac. anti-actina. El 50% ( $n=11$ ) fue DRB1\*1301 (controles 8%, RR 11,  $X^2$  23.8,  $p=0.00002$ ). Se concluye que el daño hepático producido por VHA correlaciona con la presencia de Ac. anti-actina. La infección autolimitada está asociada a un haplotipo HLA diferente al asociado a las formas prolongadas. Esta asociación es la misma que acompaña a los pacientes con PAH, apoyando la hipótesis de que en individuos susceptibles el VHA jugaría un papel en el desencadenamiento de la enfermedad.

- 419. Subclonado y expresión del antígeno Ro/SS-A para la detección por ELISA de anticuerpos específicos en pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES).** Francisco J Quintana, Pablo López Bergami, Mariano J Levin

*Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET), Buenos Aires.*

La proteína Ro/SS-A (60 Kd) es antigénica en Lupus Eritematoso Sistémico (LES). Esta proteína se subclonó en pGex-11T y se purificó con el fin de diseñar un ensayo de ELISA directo capaz de detectar anticuerpos específicos. La sensibilidad y especificidad del ensayo se determinaron usando un panel de 80 sueros de pacientes LES, 20 de pacientes infectados por *Leishmania sp.*, 10 de pacientes infectados por *Trypanosoma cruzi* y 20 sueros normales. La línea de corte se estableció como la media más 3 desvíos estándar de la D.O. de los sueros normales. El antígeno recombinante sólo fue reconocido por un 35 % de los sueros LES, obteniéndose títulos de hasta 24600. Estos resultados fueron confirmados por Western blot. Esta prevalencia de anticuerpos anti Ro es similar a la obtenida anteriormente utilizando otros kits diagnósticos. El ensayo de ELISA descrito puede complementar la determinación de rutina de anticuerpos anti-Ro en pacientes LES que habitualmente se realiza por inmunofluorescencia contra núcleo, ya que al ser muy específica no genera falsos positivos por reacción cruzada con otras proteínas ácidas o nucleares.

- 420. Distribución de frecuencias de antígenos HLA-a en poblaciones aborígenes argentinas.** J Larriba, M Capucchio, L Sala, C Coltruelo, P Blanco, L Fainboim

*Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas José de San Martín, Buenos Aires*

La distribución de antígenos HLA en poblaciones aborígenes sudamericanas muestra un limitado polimorfismo. En este trabajo se estudió la distribución de antígenos HLA-a en tres poblaciones aborígenes argentinas: Chiriguano (C) n=35, Wichi (W) n=14, Toba (T) n=56 por métodos moleculares de baja resolución (PCR-SSO). **Resultados:** se observó una mayor frecuencia fenotípica de los antígenos: HLA-A31 (C=48,6%, W=50%, T=51,8% Vs 11,4% en caucásicos argentinos CA); HLA-A68 (C=34,3%; W=28,6%; T=17,9% Vs 3,8% en CA). Se encontró una mayor frecuencia del antígeno HLA-A24 en población Wichi (74% Vs 26,6% en CA) y una menor frecuencia en población Toba (5,4% Vs 26,6% en CA). Asimismo antígenos presentes en la población caucásica no fueron hallados en las muestras analizadas. No se observó diferencia en las frecuencias del antígeno HLA-A2 entre C, T, W y CA, sin embargo en las poblaciones aborígenes se encontró el alelo HLA-A\*0219 no presente en caucásicos. Existe una diferente distribución de frecuencias antigénicas en los tres grupos estudiados y con una limitada diversidad, característica de comunidades cerradas.

- 421. Tipificación de antígenos de Histocompatibilidad (HLA) clase I por Biología Molecular (BM). Correlación con métodos serológicos.** S Albano, V Mas, T Alvarello, V Gómez, C Giraud.

*Laboratorio HLA e Inmunogenética, Hospital Privado de Córdoba, Fundación para el Progreso de la Ciencia, Córdoba*

La introducción de la BM en HLA ha causado gran efecto en estudios poblacionales, asociación a enfermedades y tipificación para trasplante. Inicialmente aplicadas a clase II, los HLA clase I se incorporan recientemente por su mayor polimorfismo. El objetivo de este trabajo es tipificar por BM antígenos HLA clase I, correlacionarlos con serología, en la población de Córdoba. Esto permitiría definir el extenso polimorfismo. Se estudiaron 87 individuos no relacionados, 48 h.; 39 m; edad  $37 \pm 21$ a. La serología se realizó por linfocitotoxicidad. El DNA fue amplificado por PCR y analizado por hibridación. Los primers y probes pertenecen al

VIII taller Latinoamericano. La BM coincide con la serología en un 97%. De los HLA-A,1 no se pudo asignar por BM y si por serología. Con HLA-B,6 haplotipos no pudieron asignarse. Las frecuencias génicas fueron: HLA-A 0101 (20%) 1101/2 (18,7%), 68011/12/02 (11,25%); 0301(11,25%) HLA-B 35.3 ( 23,81%); 14 (16,6%), 511 (16,67%), 18 (10,71%) entre otros 1-Los métodos de BM permiten lograr mayor y mejor resolución. 2-Algunos de los probes utilizados deberían ser reestudiados para permitir la tipificación correcta de los haplotipos no asignados.

- 422. Tipificación molecular del locus HLA-C en poblaciones indígenas de la República Argentina.** P Barrionuevo, GC Theiler, ML Satz, L Fainboim

*Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, UBA.*

La función principal de las moléculas de histocompatibilidad de clase I (HLA-A, B y C) es presentar péptidos antigénicos a los linfocitos T CD8+. Nuestro laboratorio estableció recientemente la tipificación molecular del locus HLA-C por PCR-SSO: amplificación «genérica» del locus HLA-C (PCR) y posterior hibridación con un panel de 52 oligonucleótidos secuencia-específicos (SSO). Se estudiaron por PCR-SSO dos poblaciones indígenas argentinas: Mapuches (Map), n=18 y Chiriguano (Chi), n=22 y una población caucásica sana de la ciudad de Buenos Aires (n=31). En Map se encontraron 12 alelos, el 50% de los individuos presentó la variante Cw\*0702 y el 44,44% de los individuos presentó la variante Cw\*0401. En Chi se encontraron 9 alelos, el 36,36% presentó la variante Cw\*0702, el 36,36% presentó la variante Cw\*0401 y el 45,45% de los individuos presentó la variante alélica Cw\*0304. Ambas poblaciones presentaron una muy restringida variabilidad, a diferencia de lo que ocurre en la población caucásica de Bs. As. en la cual se encontraron al menos 23 alelos. En resumen, ambas poblaciones indígenas presentaron alta frecuencia en las variantes alélicas Cw\*0401 y Cw\*0702, siendo sin embargo muy baja la frecuencia de Cw\*0304 en los mapuches (5,55%).

- 423. Enfermedad de Kawasaki(ek). Evaluación inmunológica de 20 casos.** S Krasovec\*, L Bezrodnik\*, M Gaillard\*, E Vainstein\*\*

*\*Inmunología, \*\*Clínica Médica, Hospital de Niños R. Gutiérrez, Buenos Aires*

La vasculitis multisistémica de la EK es mediada por mecanismos inmunológicos; 20 pacientes con EK, 17 en fase aguda y 3 en fase subaguda, fueron evaluados inmunológicamente. Se realizó al ingreso: dosaje de niveles séricos de Igs G,A,M y C3,C4, por nefelometría. Investigación de autoanticuerpos en suero (FAN,ANCA) por IFI. Análisis de poblaciones linfocitarias (CD3, CD4, CD8, CD20, CD25, DR, CD56) y citoquinas intracitoplasmáticas (TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL2, IL4, IFN $\gamma$ ) en sangre periférica, por citometría de flujo. Las citoquinas se midieron también al 5° y 30° días post-tratamiento con gamaglobulina endovenosa. Resultados: un caso presentó el patrón completo típicamente descrito en fase aguda: hipergamaglobulinemia de los 3 isotipos G,Ay M; aumento de células CD4+ con descenso de CD8+; expansión de población B, CD25+ y DR. El resto de los casos mostró patrones variables, aunque el elemento más constante fue el elevado porcentaje de células CD25+ en 13/16 casos. Se detectaron autoanticuerpos (FAN++) en un solo caso. No se pudo establecer un perfil constante en los niveles de citoquinas intracitoplasmáticas y séricas.

- 424. Estudio inmunohematológico de pacientes con purpura trombocitopénica autoinmune.** E Solís, S Chialina, C Fornes, H Menzella, V Nicolovich

*Area Inmunohematología, Unidad Docente Banco Central de Sangre, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas*

La Púrpura Trombocitopénica Autoinmune (PTAI) se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos contra antígenos de la membrana plaquetaria con la consecuente remoción de las

plaquetas circulantes por el sistema mononuclear fagocítico. Aplicamos un protocolo de estudio inmunohematológico a pacientes con diagnóstico clínico de PTAI. Este protocolo que incluye el test de aglutinación (TA) y la inmunofluorescencia de plaquetas en suspensión que nos permitió evaluar un amplio espectro de especificidades de anticuerpos antiplaquetarios. Se estudiaron 219 pacientes de los cuales 109 (49.77%) presentaron trombocitopenias primarias y 110 (50.23%) secundarias a otras patologías. Se obtuvieron resultados positivos en 130 casos (59.36%). De las PTAI primarias 90 (82.6%) fueron positivas y 40 (36.7%) de las secundarias. El porcentaje de positividad es significativamente mayor para las PTAI primarias que las secundarias ( $p < 0.01$ ) y el de las secundarias a patologías con compromiso del SI es mayor que las que tienen una enfermedad de base sin afectación directa del SI (asociación levemente significativa,  $p < 0.10$ ).

**425. Defecto en la respuesta linfoproliferativa (RL) in vitro hacia antígenos micobacterianos en pacientes con artritis reumatoidea (AR).** ML Bay, M Goñi, B Pons-Estel, A Gentiletti, S Gentiletti, F Rondelli, O Bottasso

*Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR, Rosario*

Dada la potencial vinculación entre el contacto con microbios medioambientales y la AR, se investigó la RL *in vitro* ante la estimulación con una amplia gama de antígenos micobacterianos extraídos de *M. tuberculosis*, *avium*, *duvalii*, *fortuitum*, *flavescens*, *gilvum*, *gordanae*, *kansasii*, *leprae*, *malmoense*, *vaccae*, *xenopi*, *nonchromogenicum*, y mitógenos (Concanavalina A -Con A- y Pokeweed -PWM-). Se incluyeron 19 pacientes con AR no tratados y 18 controles sanos (Co), sin diferencias en sexo y edad. Las células mononucleares periféricas se cultivaron durante 5 días y los resultados se analizaron en base al índice de estimulación -IE- (cpm estimulado/cpm basal). Los IE de los pacientes con AR para los extractos micobacterianos se ubicaron por debajo de los Co, siendo significativos en los siguientes casos (media±es): *M. fortuitum*, Co 1.3±0.2 AR 0.7±0.1 ( $p < 0.03$ ); *M. flavescens*, Co 2.1±0.4 AR 1.1±0.2 ( $p < 0.02$ ); *M. leprae*, Co 8.5±1.9 AR 4.9±1.1 ( $p < 0.05$ ); *M. nonchromogenicum* Co 1.3±0.2 AR 0.9±0.1 ( $p < 0.05$ ); *M. xenopi* Co 2.7±0.5 AR 1.4±0.2 ( $p < 0.02$ ). La respuesta hacia ConA y PWM no difirió. Los pacientes con AR denotan un descenso en la RL hacia antígenos micobacterianos más notorio para las cepas de crecimiento rápido.

**426. Efecto inmunomodulador de la fluoxetina (Flu) sobre un modelo de depresión murina.** Valeria Ayelli Edgar, AM Genaro, GA Cremaschi, L Sterin-Borda

*CEFYO-CONICET, Buenos Aires*

Anteriormente demostramos que el antidepressivo Flu ejerce un efecto modulador sobre la actividad proliferativa de células inmunocompetentes. En el presente trabajo estudiamos la capacidad de respuesta proliferativa de células T y B en un modelo de depresión reactiva (D), así como su relación con la expresión de receptores colinérgicos (R Ach) y el efecto de la Flu sobre estos parámetros. Comprobamos que las células B<sub>D</sub> presentaron una expresión de R Ach, ausente en B<sub>N</sub>, ( $X \pm ES$ , Bmáx /pmol/10<sup>6</sup> cél: 2.8±0.5), capaces de responder al carbacol con incremento de GMPc, asociado con una mayor capacidad proliferativa (IE con LPS B<sub>N</sub>: 90±15 vs B<sub>D</sub>: 189±18,  $p < 0.01$ ). En células T<sub>D</sub>, en cambio, encontramos un aumento de R Ach (T<sub>N</sub>: 7.1±1.1 vs T<sub>D</sub>: 43.1±4.2,  $p < 0.01$ ) pero desacoplados a sus señales intracelulares, asociado a una menor capacidad proliferativa (IE con Con A T<sub>N</sub>: 184±19 vs T<sub>D</sub>: 105±13). La hiperactividad de células B<sub>D</sub> fue acompañada por la aparición tardía de anticuerpos séricos anti-M<sub>1</sub>. El tratamiento temprano con Flu revirtió estos efectos. Se concluye que la depresión cursaría con un desbalance colinérgico que produciría alteraciones inmunológicas, que serían revertidas por la Flu.

**427. Perfil clínico inmunológico en 27 pacientes pediátricos con Inmunodeficiencia Común Variable.** M Galicchio, M

Oleastro, S Rosenzweig, A Roy, A Ribas, J Rossi, L Pérez, F Quiroga, A Bernasconi, M Zelazko.

*Servicio de Inmunología, Hospital de Pediatría J. P. Garrahan, Buenos Aires.*

La Inmunodeficiencia Común Variable (IDCV) es un grupo heterogéneo de desórdenes caracterizados por una defectuosa formación de anticuerpos e hipogamaglobulinemia IgG e IgA con niveles variables de IgM. Describimos las manifestaciones clínicas e inmunológicas de 27 pacientes con IDCV. Edad media de comienzo de las manifestaciones clínicas: 2,16 años (2m-7a) siendo el 85% infecciones respiratorias. Hallazgos: infecciones tracto respiratorio 27/27; compromiso SNC 10/27; diarrea recurrente/crónica 9/27; fenómenos autoinmunes 7/27. Presentaron panhipogamaglobulinemia 11/27. Respuesta deficiente al toxoide tetánico 9/15 y a la vacuna antineumocócica 12/12. Trece pacientes mostraron ausencia de linfocitos B. El 48% tuvo inversión CD4/CD8 y 17/25 baja respuesta proliferativa a uno o más mitógenos. Expresión de ligando de CD40 normal en 14 pacientes evaluados. Conclusiones: observamos un elevado porcentaje de pacientes con ausencia de linfocitos B. Este grupo no se asoció con una edad de comienzo más temprana, mayor gravedad clínica o panhipogamaglobulinemia. El compromiso de la inmunidad mediada por células fue independiente de la ausencia o presencia de linfocitos B.

**428. Método de marcación para el diagnóstico de portadoras de Síndrome de Hiper IgM.** MF Quiroga, M Vila Pérez, MI Goldaracena, J Rossi, M Zelezko

*Servicio de Inmunología, Hospital de pediatría J. P. Garrahan, Buenos Aires*

El CD40L se expresa en células T helper activadas y su interacción con el CD40 es esencial para la proliferación y diferenciación de células B. Mutaciones en su gen provocan el Síndrome de Hiper IgM (SHIgM), una rara patología que se caracteriza por la falta de expresión de esta molécula. Se evaluaron muestras de 4 individuos normales, 2 pacientes con SHIgM y 1 portadora. Se muestran los resultados obtenidos utilizando dos protocolos de marcación: el primero en dos colores, considerando la totalidad de los linfocitos como población de estudio y el segundo en tres colores, acotando, mediante una estrategia de gating negativo, la población de estudio a las células T CD8 negativas. Como resultado, en los individuos normales el 27% de los linfocitos expresan el CD40L al utilizar el 1<sup>er</sup> protocolo, mientras que con el 2<sup>do</sup> (tres colores) se observa un porcentaje de expresión del 82% en los linfocitos CD3+/CD8-. En los pacientes con SHIgM se observa ausencia de esta molécula mientras que en la madre de estos pacientes se observa una distribución bimodal, con el 40% de sus células CD3+/CD8- positivas para el CD40L, característico de su condición de portadora. Con este procedimiento de marcación se aumenta la sensibilidad de detección (se purifica la población de estudio), posibilitando el análisis más certero de deficiencias intermedias, como ser portadoras del SHIgM o Inmunodeficiencia Común Variable.

**429. Inmunodeficiencia primaria no clasificada (idnc) en 2 hermanos.** MI Gaillard, L Bezrodnik, S Krasovec

*Inmunología, Hospital de Niños R. Gutierrez, Buenos Aires*

Se presenta una IDNC, con linfopenia CD4, no HIV, con diferentes presentaciones clínicas y perfil inmunológico. Caso 1. Debuta a los 3 años de edad con varicela hemorrágica severa con compromiso multisistémico. A los 10 años de edad presenta verrugas vulgares diseminadas y 2 otitis supuradas. Tiene hipergamaglobulinemia G, A y M. Isohemaglutininas normales. Respuesta funcional anticorpórea a antígenos proteicos y polisacáridos normal. Poblaciones CD3+, CD4+ y CD8+ disminuidas. CD20+ y NK normales. Proliferación celular frente a mitógenos ausente. Prueba cutánea + a Candidina, resto negativas. Caso 2. Desde el 5<sup>o</sup> mes de edad, infecciones piógenas severas recidivantes, des-

nutrición progresiva y anemia. Igs séricas normales, con funcionalidad ausente a proteínas y polisacáridos. Isohemaglutininas negativas. Linfopenia CD4+. Aumento de NK y DR. Pruebas cutáneas negativas. Recibe tratamiento con gamaglobulina endovenosa sustitutiva. Se evaluó al resto de los hermanos, un hermano de 24 años, asintomático presenta linfopenia CD4+, aumento de NK y CD25+ e hipogamaglobulinemia G y M. Pensamos en una IDNC combinada probablemente ligada al X.

**430. Síndrome Linfoproliferativo y Autoinmune por Defecto en la Apoptosis mediada por Fas.** M Oleastro, L Perez, S Danielian, G Basílico, M Zelazko

*Servicio de Inmunología, Hospital de Pediatría J. P. Garrahan, Buenos Aires*

Linfocitos autorreactivos son eliminados de la circulación a través de un proceso apoptótico mediado por la interacción de la molécula Fas/CD95 con su ligando. Nuestro objetivo es presentar las características clínicas e inmunológicas de un paciente con una mutación en el gen *fas*. Se trata de un paciente varón, nacido de padres no consanguíneos, que ha presentado esplenomegalia y poliadenopatías crónicas generalizadas, artritis aguda, púrpura y episodios de anemia Coombs positiva, neutropenia y trombocitopenia. El estudio inmunológico evidenció linfocitosis (9150/ $\mu$ L), hipergamaglobulinemia (IgG:2420 mg/dl), inversión CD4/CD8, aumento de linfocitos TCR $\alpha\beta$ +CD4-CD8- (5%), disfunción natural killer e hipocomplementemia C3 (75mg/dl) y C4 (11 mg/dl). Distintos auto-anticuerpos, como factor reumatoideo, factor anti-nuclear, anticuerpos anti-músculo liso, anti-ADN y anticardiolipinas, estuvieron presentes. Con respecto a la molécula Fas, se documentó expresión normal en células mononucleares de sangre periférica cultivadas con PHA e IL-2 pero apoptosis inducida por CD95 defectuosa (19% del control del día). El análisis molecular del gen *fas* permitió detectar la presencia de una mutación compleja en el exón 9.

**431. Caracterización de una nueva y compleja mutación del gen *fas* en un paciente con síndrome linfoproliferativo (SLP).** S Danielian, G Basílico, J El Hakeh, M Oleastro, M Zelazko

*Servicio de Inmunología, Hospital de Pediatría J. P. Garrahan, Buenos Aires*

La apoptosis es un proceso fisiológico en el desarrollo y homeostasis del sistema inmune. El receptor Fas y su ligando FasL tienen un rol primordial en este evento. En nuestro Servicio se ha diagnosticado un paciente con SLP y manifestaciones de autoinmunidad que mostró *in vitro* una apoptosis, de sus linfocitos, inducida vía Fas marcadamente reducida respecto de los normales. **Objetivo:** determinar las bases moleculares de estos defectos mediante el estudio del locus genómico de *fas*. **Materiales y Métodos:** puesta a punto de SSCP como técnica de rastreo de mutaciones del gen *fas* y estrategias combinadas de secuenciación directa y de análisis de secuencia de los productos obtenidos por clonación del fragmento alterado en SSCP. **Resultados:** el SSCP mostró en la región que codifica para el llamado "dominio de muerte" de la proteína una migración electroforética alterada. Las estrategias de secuenciación permitieron demostrar que el paciente es heterocigota para una nueva y compleja mutación en *fas* (delección de 23bp, seguida de una inserción de 8 bp y una delección de 1 bp). **Conclusión:** La descripción de esta nueva mutación de *fas* en un paciente con SLP y con manifestaciones de autoinmunidad pone en evidencia la importancia de la apoptosis de linfocitos maduros en el mantenimiento de la tolerancia.

**432. Regulación de la apoptosis por complejos inmunes en leucemia linfocítica crónica de células B (LLC-B)** Romina Gamberale, Gabriela Salamone, Analía Trevani, M Scolnik, G Arrossagaray, Marcela Sarmiento, J Geffner, Mirta Giordano

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

Previamente reportamos que los complejos inmunes (CI) inhiben la apoptosis espontánea o inducida por fludarabina de las células LLC-B. En este trabajo demostramos que la incubación con CI durante 48 hs aumenta la expresión de HLA-DR en las células leucémicas ( $p < 0,005$ ;  $n = 10$ ). Los CI no afectarían directamente a las células leucémicas ya que no son capaces de inducir movilización de calcio intracelular, como sí lo hacen en los monocitos de los pacientes. Asimismo, se encontró que la apoptosis de células LLC-B deplecionadas de monocitos, células NK y linfocitos T se inhibe significativamente menos con CI: % de inhibición de apoptosis espontánea: células mononucleares totales:  $64 \pm 5$ , células deplecionadas:  $3 \pm 2$  ( $p < 0,005$ ,  $n = 5$ ), % de inhibición de apoptosis inducida por fludarabina (25  $\mu$ g/ml): células totales:  $38 \pm 6$ , células deplecionadas:  $8 \pm 4$  ( $p < 0,01$ ,  $n = 8$ ). La inhibición de la apoptosis no se debe a la inducción de TNF $\alpha$  por los CI. Estos resultados indican que los CI pueden modular la activación de las células LLC-B actuando sobre leucocitos periféricos no-leucémicos.

**433. Genes mediadores de apoptosis en la Enfermedad Celíaca.** AE Rubio<sup>1</sup>, S De Rosa<sup>2</sup>, L Fainboim<sup>1</sup>, AC Cheriavsky<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires; <sup>2</sup> Servicio de Gastroenterología, Hospital de Pediatría J. P. Garrahan, Buenos Aires

La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía de la región proximal del intestino delgado que se desarrolla como consecuencia de la intolerancia al gluten en individuos genéticamente predispuestos. Dado que el aplanamiento de las microvellosidades intestinales característico de la enfermedad no se debe a una disminución en la proliferación celular, un aumento en la apoptosis podría mediar una mayor eliminación celular. Se llevó a cabo el análisis de la expresión de genes mediadores e inductores de apoptosis por RT-PCR en biopsias intestinales de pacientes con EC (BEC) y de individuos control (BCo). Sólo se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de perforina en BEC ( $n = 6$ ) con respecto a BCo ( $n = 3$ ) ( $18.28 \pm 13.46$  vs  $0.45 \pm 0.2541$ ,  $p = 0.0238$ ) (test Mann-Whitney U). Los niveles medios de expresión fueron mayores en las BEC para los genes *bak* y *bax*, no observándose diferencias en la expresión de *bcl-2* entre los grupos estudiados. El efecto citotóxico de las perforinas observado en BEC podría estar regulado por los genes *bak* y *bax* siendo independiente de *bcl-2*.

**434. Expresión de isoformas de CD44 en tumores espontáneos murinos.** M Sánchez Lockhart, C García, M Diamant, P Cabrera, S Danka Klein, S Hajos

*IDEHU-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA y Bioterio del Instituto de Oncología Ángel H. Roffo, Buenos Aires*

El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar la expresión de las isoformas de la molécula de adhesión CD44 en cuatro tumores espontáneos murinos (Balb/C), con el propósito de encontrar alguna relación con la agresividad y/o potencial metastásico de los mismos. Se analizó un tumor de pulmón (P07), dos de mama (M05 y M38) y una leucemia (LB). Para estudiar la expresión de ARNm del gen del CD44 se utilizó una RT-PCR. Se ensayaron un promedio de ocho ratones Balb/C por cada tumor en estudio, analizando tanto los tumores primarios como los distintos órganos implicados. Salvo el LB, todos los tumores expresaron el CD44 standard y una isoforma de mayor peso molecular. Los órganos analizados mostraron una expresión basal igual a la de los ratones control, que se modificó en la mayoría de los órganos con la evolución de la enfermedad. En todos los casos los ganglios, pulmones y bazo mostraron la aparición de isoformas de mayor peso molecular mientras que en el hígado mantuvo su expresión basal. Podemos concluir que: a) la modificación en la expresión de las isoformas del CD44 en los órganos implicados en el proceso tumoral sugiere su participación en el mismo y b) no nos fue

posible encontrar una correlación entre la alteración de la expresión del CD44 con el mal pronóstico de la enfermedad o agresividad del tumor.

**435. Producción de óxido nítrico (NO) por antígenos de *Y. enterocolitica* O:8 en un modelo de artritis reactiva en hamsters.** Silvia Di Genaro, D. Ramirez, A. M. de Guzmán.

Area Microbiología. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis.

Los componentes de *Yersinia* que inducen artritis reactiva (AR) no son conocidos. El objetivo del presente estudio fue investigar la producción de NO en células mononucleares de hamsters inyectados con antígenos de *Yersinia*. Los animales recibieron 2,5 µg/g de proteínas de citoplasma, membrana externa (ME), secretadas (Yops), o solución fisiológica (grupo control). Tres días después se obtuvieron células mononucleares de sangre, separaron en adherentes (macrófagos) y no adherentes (linfocitos), y cultivaron 72 hs. En los sobrenadantes se midieron NO<sub>2</sub><sup>-</sup> / NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en condiciones basales (reacción de Griess). La respuesta de IgG específica, en sueros de 0, 3 y 23 días postinyección (p.i.), se midió por Elisa e inmunoblotting. Se obtuvieron niveles significativos de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en macrófagos de animales inyectados con ME (p<0.002, comparado con el grupo control), y en macrófagos y linfocitos de aquellos que recibieron Yops (p<0.002 y p<0.01, respectivamente). IgG específica para ME y Yops fue significativa el día 23 p.i. (p<0.005 y p<0.001, respectivamente). Importante reacción fue detectada contra bandas de 71 y 50 kDa de Yops, y contra la banda de 80 kDa de ME. Se concluye que en el modelo animal estudiado, antígeno de ME y Yops inducen activación sistémica de células mononucleares para la producción de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> / NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; y la respuesta de anticuerpos específicos.

## ENDOCRINOLOGIA: OVARIO Y TESTICULO

**436. Localización inmunocitoquímica ultraestructural de 3β-hidroxi esteroide deshidrogenasa (3β HSD) en células de Leydig de rata y sus precursores.** Mariana Musse, Eliana Pellizzari, Marcela Venara, Selva Cigorraga, H Chemes.

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

Los precursores inmaduros (PI) de células de Leydig (CL) secretan testosterona y poseen enzimas esteroidogénicas y receptores a LH, pero presentan una disminución de la sensibilidad y la respuesta máxima a la estimulación con hCG en relación con las de CL diferenciadas. Hemos localizado por inmunocitoquímica ultraestructural la 3β-HSD en CL y PI de rata usando un anticuerpo policlonal y un sistema de revelado con peroxidasa. Las CL diferenciadas evidenciaron un abundante retículo endoplásmico liso (REL) dentro de cuyas cisternas se observó una intensa localización de la enzima, mientras que las mitocondrias, gotas lipídicas y núcleos fueron negativos. Los PI mostraron un aspecto ultraestructural indiferenciado, con escaso desarrollo del REL. La 3β HSD se localizó de manera difusa en el citoplasma, sin relación topográfica con el escaso REL. El sitio clásico de localización de esta enzima es la membrana microsomal en la que se halla asociada a otras enzimas esteroidogénicas. La particular localización fuera del REL (de la 3β HSD en PI), podría ser responsable, al menos en parte, de la disminución en la capacidad esteroidogénica de este tipo celular.

**437. TNFα en medio condicionado de macrófagos testiculares de ratas con orquitis auto-inmune.** MO Suescun<sup>1,2</sup>, RS Calandra<sup>2,3</sup>, B Denduchis<sup>4</sup>, L Lustig<sup>4</sup>

<sup>1</sup>IMBICE; <sup>2</sup>Facultad de Ciencias Exactas, UNLP; <sup>3</sup>IBYME; <sup>4</sup>CIR, Facultad de Medicina, UBA.

Previamente demostramos que el medio condicionado (MC) de macrófagos testiculares de ratas con orquitis autoinmune experi-

mental (OAE) modula la producción *in vitro* de testosterona. Ratas Sprague-Dawley adultas, fueron inmunizadas con homogenado testicular y adyuvantes. En el 65% de las mismas se indujo una OAE severa a los 80-130 días de la primera inmunización, caracterizada por descamación del epitelio germinal, atrofia tubular y aumento del número de macrófagos, linfomonocitos y células de Leydig. Se aislaron macrófagos testiculares y peritoneales de ratas con OAE y ratas controles. Se determinó TNFα por ELISA en el MC de macrófagos luego de 24 hs de cultivo. Los resultados muestran un aumento significativo (p<0.05) en el contenido de TNFα en el MC proveniente de macrófagos testiculares de ratas con OAE (244 ± 19.5 vs C:167 ± 13.7 pg/ml). En presencia de LPS se observó un incremento similar. Este efecto no fue observado con el MC de macrófagos peritoneales. El aumento de TNFα detectado sugiere que esta citoquina, que es secretada por los macrófagos, está involucrada en la modulación local de la esteroidogénesis de la célula de Leydig.

**438. Elementos neuronales testiculares en el mono.** Mónica Frungieri<sup>1,2</sup>, H Urbanski<sup>3</sup>, R Calandra<sup>1</sup>, A Mayerhofer<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires, Argentina; <sup>2</sup>Anatomical Institute, Technische Universität München, Germany; <sup>3</sup>Oregon Regional Primate Research Center, USA.

Recientemente se describió la presencia de células similares a neuronas (CSN) catecolaminérgicas (cat) en testículos prepuberales del mono Rhesus (Mayerhofer y col., Biol.Reprod. 55:509,1996). El presente es un estudio inmunohistoquímico ontogénico (1/2,1,2, 3,6 y 30 años;n=5/grupo) de la naturaleza, distribución y frecuencia de elementos neuronales en testículos de mono Rhesus. Fibras nerviosas (FN) y CSN de fenotipo elongado bi/multipolar inmunoreactivas para el neurofilamento 200 (marcador neuronal), tirosina hidroxilasa y neuropéptidos NPY y VIP, fueron localizadas en el espacio perivascular, en la pared tubular y próximas a células de Leydig. Se observaron FN a todas las edades aunque predominaron luego del aumento de la LH sérica (1-2 años: 0.06 ± 0.01; 6-8 años: 0.15 ± 0.01\* FN/túbulo,\*p<0.05). En cambio, sólo se detectaron CSN en testículos inmaduros. Estos resultados evidencian la existencia de plasticidad neuronal en el testículo e indican que CSN cat/peptidérgicas podrían participar en la regulación de los eventos que conducen a la eclosión de la pubertad en el mono. (Subsidios de DAAD,DFG,Volkswagen-Stiftung, NIH).

**439. La influencia colinérgica al final de la preñez no modifica la liberación de Progesterona ovárica.** M Casais, AM Rastrilla, L. Aguado.

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

Trabajando con el sistema *in vitro* Ganglio Celíaco-Nervio Ovárico Superior-Ovario, estandarizado en nuestro laboratorio, se ha demostrado que estimulando el ganglio, tanto con agentes adrenérgicos como colinérgicos, se modifica la liberación de progesterona (P) ovárica. El objetivo presente fue estudiar la influencia colinérgica al final de la preñez en la rata. Se adicionó acetilcolina (Ach), atropina (At) o hexametonio (C6) 10<sup>-6</sup> M al ganglio y se dosó P ovárica a los 30, 60, 120 y 180 minutos por RIA. Test de Student-Significancia p<0.05. Los resultados indicaron que a pesar de existir un tono colinérgico inhibitorio sobre la liberación de P a los 15 días de preñez (resultados ya publicados), el mismo iría desapareciendo a medida que la preñez avanza. Así podemos mostrar que tanto Ach (0.25±0.02; 0.18±0.02; 0.05±0.008), At (0.21±0.02; 0.14±0.01; 0.08±0.01), y C6 (0.18±0.03; 0.23±0.03; 0.07±0.02), no presentan mayores variaciones respecto de los basales de día 19 (0.21±0.006), 20 (0.17±0.01) y 21 (0.04±0.005) respectivamente. Se concluye que posiblemente el tono colinérgico sería importante durante la funcionalidad del cuerpo lúteo pero no al final de la gestación.

**440. Modulación Neural del efecto de LH sobre el Cuerpo Lúteo de la Preñez.** M Casais, AM Rastrilla, L Aguado

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

A fin de estudiar la regulación neuroendocrina a nivel periférico, el objetivo del presente trabajo fue analizar cómo la acción de agentes adrenérgicos en ganglio celíaco modifica la aparente inactividad de LH sobre la liberación de progesterona (P) ovárica a los 15 días de preñez en la rata. Para ello, se usó el sistema integrado *in vitro* Ganglio Celíaco-Nervio Ovárico Superior-Ovario (GC-NOS-O), donde el GC y el O ocupan celdas de incubación separadas y permanecen unidos por el NOS, metodología descrita en trabajos previos. En la celda ganglionar se adicionó, noradrenalina (Ne) ó fentolamina (Ph) ó propranolol (Prop), en concentración 10-6M, y en la ovárica, LH 50ng/ml. La P liberada se determinó por RIA, a los 30, 60, 120 y 180 minutos. Se utilizó Test de Student-significancia  $p < 0.05$ . Los resultados, teniendo en cuenta los valores basales (sistema no estimulado) y el control LH (sólo LH en ovario) indicaron que los niveles de P no se modifican ( $0,30 \pm 0,04$  vs  $0,29 \pm 0,02$ ). A partir de la acción conjunta de LH y los agentes adrenérgicos, tanto Ne como Ph provocan una disminución en la liberación de P en relación al control LH ( $0,18 \pm 0,008$  vs  $0,29 \pm 0,02$   $p < 0,001$  y  $0,15 \pm 0,02$  vs  $0,29 \pm 0,02$   $p < 0,001$ ) respectivamente, mientras Prop no modifica la liberación de P ( $0,25 \pm 0,02$  vs  $0,29 \pm 0,02$ ). Se concluye que el efecto adrenérgico por vía neural condiciona la acción de la LH sobre el cuerpo lúteo de preñez.

**441. Competencia entre adrenalina intracerebroventricular y LH endovenosa sobre la liberación de progesterona ovárica de rata en diestro 2.** MA De Bortoli, M Garraza, L Villegas, L Aguado

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

Adrenalina (Ad) inyectada en ventrículo cerebral (icv) disminuye la progesterona en sangre de vena ovárica (Po), entre 1 y 25 min. después, en ratas en diestro 2 (D2). En este trabajo se investigó la competencia entre el efecto central de adrenalina icv, que llega al ovario por el nervio ovárico superior, y el de LH circulante en D2. Se determinó una dosis de LH ovina (LHo=2 µg) que, inyectada endovenosa (iv), aumentó la Po a  $151 \pm 18$  ng/ml (media ± SEM). En el *esquema A*, ratas en D2 fueron inyectadas icv con 5 µg de Ad y, 3 min más tarde, con LHo iv. En el *esquema B*, ratas en D2 fueron inyectadas con LHo iv y, 7 min más tarde, con Ad icv. En ambos esquemas se colectó sangre de vena ovárica izquierda durante 25 min y se dosó Po por RIA. *Resultados:* (media ± SEM ng/ml) Po basal:  $39,8 \pm 1,65$ . En *A*, la Po disminuyó hasta los 3 min ( $p < 0,01$ ) (momento de la inyección iv de LH) y luego aumentó hasta  $64 \pm 7,5$  a los 25 min. En *B* la Po aumentó hasta los 7 min ( $p < 0,001$ ) (momento de la inyección icv de Ad), luego disminuyó hasta los 11 min, para aumentar nuevamente hasta alcanzar a los 25 min  $70 \pm 8,9$ . *Conclusiones:* el estímulo adrenérgico central, depresor de la liberación de progesterona ovárica en diestro 2, compite con el efecto estimulador de la LH exógena que actuaría a nivel periférico.

**442. Efecto de la sección del Nervio ovárico Superior sobre la esteroidogénesis *in vitro* en el primer ciclo estral.** M Forneris, M Lafarque, L Aguado

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

Hemos observado previamente que el corte del nervio ovárico superior en ratas de 4 días de edad (NOS) provoca atraso de la apertura vaginal y cambios hormonales durante el desarrollo. Objetivo: evaluar el efecto de la denervación en la liberación de esteroides en respuesta a gonadotrofinas y agentes adrenérgicos *in vitro*. Se trabajó con ratas NOS y controles (C) sacrificadas en el primer Estro (E), Diestro (D) y Proestro (PE). Se colectó san-

gre y los ovarios se incubaron en solución Krebs-Ringer con o sin LH (50ng/ml) o FSH (50ng/ml) o Isoproterenol (Iso/  $10^{-6}$  M) por 3 hs a 37°C. Se determinó progesterona (P) y estradiol ( $E_2$ ) por RIA. Niveles séricos de P (ng/ml) y de  $E_2$  (pg/ml) en el grupo NOS aumentaron respecto a sus (C) en D y PE ( $p < 0,01$ ). *In vitro*, ratas NOS respecto a sus (C); Liberación de P (ng/mg ovario): Basal: aumentó en D ( $p < 0,05$ ). +LH: no hay cambios en el ciclo. +FSH: disminuyó en PE y E ( $p < 0,001$ ) y aumentó en D ( $p < 0,01$ ), +Iso: disminuyó en E, PE y aumentó en D ( $p < 0,01$ ). Liberación de  $E_2$  (pg/mg ovario): Basal: aumentó en PE y E ( $p < 0,01$ ). +LH aumentó en D y PE ( $p < 0,001$ ) y E (0,05). +FSH: aumentó en E y PE ( $p < 0,005$ ). + Iso: aumentó en D, PE y E ( $p < 0,01$ ). Con las estimulaciones efectuadas, a excepción del D, en ratas NOS, se observó disminución en la liberación de P y aumento en la liberación de  $E_2$  en todos los estados.

**443. El gen bcl-X y su expresión hormono-dependiente.** R Sieira, JL Barañao, A Pecci

IByMe-CONICET y Departamento de Química Biológica, FCEN-UBA

En endometrio, la caída de los niveles de progesterona (Prog.) durante la fase secretoria conduce a la apoptosis del epitelio uterino. La muerte celular depende de la abundancia relativa de las proteínas de la familia de Bcl-2. Bcl-X, perteneciente a dicha familia, genera por splicing alternativo dos isoformas: Bcl-Xl, que inhibe la muerte celular y Bcl-Xc que la promueve. Resultados previos realizados en una línea celular de endometrio de rata (RENTROP) demostraron que el tratamiento con Prog. y/o dexametasona (DEX) incrementa los niveles de mRNA de dicho gen. En este trabajo se caracterizó la región promotora del mismo. La estructura del gen reveló la presencia de cinco promotores alternativos distantes a: -149 pb (P1), -656 pb (P2), -1.8 kb (P3), -2.7 kb (P4) y -3.4 kb (P5) respecto del codón de iniciación de la traducción. Por "primera extensión" se observó que la actividad de dichos promotores varía según el tejido analizado, siendo P2 y P5 los más activos en útero. Dicha actividad fue confirmada mediante transfecciones transientes en células RENTROP. Por otro lado, el tratamiento con Prog. + DEX indujo 5 veces la actividad transcripcional de P1, P2 y P3 sugiriendo que el aumento en los niveles de mRNA serían debidos a la inducción de la expresión génica.

**444. Cambio del efecto adrenérgico en ratas androgenizadas y con denervación ovárica neonatal.** M Rastrilla, Forneris, L. Aguado

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

Las células teco-intersticiales del ovario poseen dos vías de estimulación: una hormonal y otra neural a través del nervio ovárico superior (NOS). Es conocido que la androgenización neonatal y la sección del NOS producen hipertrofia intersticial. El propósito del presente trabajo fue estudiar si este efecto es modificado por la estimulación adrenérgica *in vitro*. Se utilizaron ratas de 4 días de edad. **Grupo I:** con administración de Testosterona (T); 1,5 mg/0,1 ml veh. oleoso vía s.c. y **Grupo II:** T y corte adicional del NOS. Los animales fueron sacrificados a los 30 días de edad, se colectó sangre troncal y los ovarios incubados en solución Krebs-Ringer bicarbonato con o sin Isoproterenol (Iso/  $10^{-8}$  M), 3 hs a 37°C. La liberación de progesterona (P) y estradiol ( $E_2$ ) en el medio se dosó por RIA. Iso provocó un aumento de la liberación de P (ng/mg ovario) y  $E_2$  (pg/mg ovario) en ambos grupos ( $p < 0,001$ ):

	P	$E_2$
I:	$0,03 \pm 0,006$ vs $0,06 \pm 0,004$	I: $7,52 \pm 0,60$ vs $11,7 \pm 0,43$
II:	$0,03 \pm 0,003$ vs $0,08 \pm 0,005$	II: $5,34 \pm 0,55$ vs $17,42 \pm 1,4$

En los niveles circulantes de P y  $E_2$  se observó un aumento en el grupo II de P ( $p < 0,005$ ) y  $E_2$  ( $p < 0,001$ ). Conclusión: es probable que los efectos descritos para la androgenización neonatal con T se produzcan a nivel central o periférico pero no en el ovario.

**445. Modulación neural del efecto de LH sobre la secreción de esteroides ováricos en Diestro.** Z Sosa de Gil, SM Delgado, L Aguado

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

El pico de LH importante en procesos de ovulación y luteinización conduce a la activación de señales que estimulan la síntesis de Progesterona (P). El objetivo fue estudiar los efectos de Noradrenalina (NA), Propranolol(Prop) y Fentolamina (Fen) en concentración final  $10^{-6}$  M en ácido ascórbico en la celda ganglionar, sobre la liberación de androstenediona ( $A_2$ ) y Progesterona (P) en presencia de LH (50 ng/ml) en la cubeta ovárica, en el sistema integrado Ganglio Celíaco-Nervio Ovárico Superior-Ovario (GC-NOS-O) en Diestro1(D1) y Diestro2(D2). Se trabajó con ratas hembras Holtzman. Se incubó el sistema en buffer Krebs-Ringer a 37°C en baño metabólico. Se extrajo líquido de incubación a los 30', 60', 120' y 180', y se dosó  $A_2$  y P por RIA. Resultados:  $A_2$  pg/mg y P ng/mg de tejido (medias±SEM), estadística: test de Student. La liberación basal de  $A_2$  en D1 30': 5,4±0,1; 60': 10,0±0,6; 120': 6,8±0,4 y 180': 11,8±0,7. Con NA, Fen y Prop ( $A_2$ ) aumenta ( $p<0.001$ ) en todos los tiempos, excepto con Prop. a los 180'. (P) basal a: 30': 0,124±0,004; 60': 0,152±0,008; 120': 0,192±0,006 y 180': 0,198±0,002. NA aumenta la liberación de P ( $p<0.001$ ) y Prop disminuye ( $p<0.001$ ) no existiendo diferencias con Fen. D2  $A_2$  basal: a 30': 3,2±0,4; 60': 15,6±0,008; 120': 32±4 y 180': 9,6±0,3. En GC aumenta la liberación  $A_2$  excepto a los 60' ( $p<0.001$ ), Prop y Fen. disminuyen respecto de sus controles. ( $p<0.001$ ) a los 60' y 120'. En cuanto a P basal: 30': 0,174±0,041; 60': 0,20±0,08; 120': 0,20±0,06 y 180': 0,18±0,02, la presencia de agonista y antagonista disminuyen en los tiempos estudiados ( $p<0.001$  vs basal). El efecto en la liberación de  $A_2$ , en D2 se observa en el tiempo, mientras en D1 es el efecto neural con una pulsatilidad de los tonos. P muestra que los receptores son de tipo inhibitorios, lo que implicaría que NA en ganglio y vía neural libera alguna otra sustancia intermedia responsable del efecto inhibitorio tanto en D1 como en D2.

**446. Noradrenalina modifica la liberación de óxido nítrico desde el ovario en un sistema integrado.** SM Delgado, Z Sosa de Gil, L Aguado

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

La presencia de la óxido nítrico sintetasa (NOS), ha sido detectada en cuerpo lúteo y células granulosas ováricas. El NO es un importante regulador de eventos fisiológicos en ovario, durante el desarrollo folicular y luteinización en células ováricas. El objetivo de este trabajo fue comprobar si la estimulación ganglionar con noradrenalina (NA), en un sistema integrado *in vitro* Ganglio celíaco (GC)- Nervio ovárico superior (NOS)-Ovario (O), modifica la síntesis de NO en ratas Holtzman adultas hembras en Proestro (PE), Estro (E), Diestro I (DI) y Diestro II (DII). Se utilizó buffer Krebs-Ringer en baño metabólico. En la cubeta ganglionar se adicionó NA, en ácido ascórbico. Se extrajo líquido de incubación a los 30', 60', 120' y 180', se dosaron nitritos (método de Griess) en el medio de cultivo de la celda ovárica. Análisis estadístico: test de Student (medias ± SEM, en nmoles de nitritos/mg tejido). Los resultados obtenidos de NO muestran un incremento en PE y E en los valores basales respecto al D1 y D2 ( $p<0.001$ ). La estimulación ganglionar con NA, aumenta la liberación de NO en PE y E ( $p<0.001$  vs basales) significativamente, en todos los tiempos. En D1 aumenta solo a los 30' y 120' ( $p<0.001$  vs basal) y en D2 disminuye ( $p<0.01$  vs basal) a los 60' y 120'. La estimulación ganglionar produciría la liberación de algún neurotransmisor en el ovario que activaría la NOS o bien se libera NO desde las varicosidades nerviosas en el ovario.

**447. Efecto de noradrenalina y neuropéptidos sobre la secreción de progesterona en ovarios de rata *in vitro* en diestro I.** M Garraza, L Villegas, M De Bortoli, L Aguado

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

La noradrenalina (NA) modifica la esteroidogénesis ovárica. La presencia de neuropéptidos y algunas de sus funciones han sido caracterizadas, por otros autores, en ovarios de ratas prepúberes. Se estudiaron los efectos de: neuropéptido Y (NPY), péptido intestinal vasoactivo (VIP) y Sustancia P (SP) (solos y con NA) sobre la liberación de progesterona (P) en ovarios *in vitro* en diestro I. Se trabajó con ratas adultas hembras vírgenes Holtzman de un peso medio: 275±25g. Se incubaron hemiovarios durante 180' en buffer Krebs-Ringer, a 37°C en baño metabólico con el agregado previo de: ácido ascórbico (Asc) 1mM, NA  $10^{-7}$  M, NPY, VIP, SP (50 ng/ml de c/péptido), y NA + los neuropéptidos. *Resultados:* (medias±SEM ng/ml) P basal Krebs: a 30'=0,36±0,03; a 60'=0,39±0,03; a 120'=0,41±0,03; a 180'=0,43±0,04. Con NPY, la P disminuye a los 30' ( $p<0.001$  vs basal). Con VIP y con SP, la P disminuye a los 30', 60' y 120' ( $p<0,05$  vs basal). P basal Asc: a 30'=0,35±0,05; a 60'=0,36±0,04; a 120'=0,37±0,05; a 180'=0,39±0,02. Con NA, P disminuye a los 30' y 60' ( $p<0.005$  vs basal) La P disminuye en todos los tiempos con NA+NPY ( $p<0.025$  vs NA), con NA+VIP y con NA+SP disminuye a los 30', 60' y 120' ( $p<0,001$  vs NA) ( $p<0,005$  vs NA). *Conclusiones:* en ratas adultas en DI se observa un patrón inverso con VIP y SP al observado en diestro II y diferente a lo visto en ratas prepúberes.

**448. Efectos de activina, folistatina e inhibina sobre la expresión de enzimas estrogénicas en células granulosas.** Sergio Ghersevich<sup>1</sup>, L Akinola<sup>2</sup>, R Viñko<sup>2</sup>, P Viñko<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Esteroides y Reproducción, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacia, Universidad Nacional de Rosario, <sup>2</sup>W.H.O.C.C.R., Universidad de Oulu, Finlandia.

Las enzimas (Ez) 17 $\beta$ -hidroxiesteroide dehidrogenasa (17HSD) tipo 1 y la citocromo P450 aromatasas (P450arom) catalizan la síntesis de estradiol en el ovario. Se examinaron los efectos de la activina (A), la folistatina (Fo) y la Inhibina (In) sobre la actividad (Act) y la expresión (Ex) de la 17HSD tipo 1 y la P450arom en cultivo de células granulosas (CG) inmaduras de rata. Las CG fueron incubadas 2 días con o sin A, In, Fo, y/o 8-Br-adenosina-3', 5'-monofosfato cíclico (8-Br-cAMP). Dosis crecientes de A (1-100 ng/ml) aumentaron la Act y la Ex de la 17HSD tipo 1 en forma dosis-dependiente. El máximo aumento lo produjo 100ng/ml de A, incrementando la Act desde  $7.7 \pm 0.3$  nmol/h/10<sup>5</sup> células (media±ES, controles) hasta  $77.9 \pm 11.5$  nmol/h/10<sup>5</sup> células (tratadas,  $P<0.01$ ) y 4.5 ± 0.5 veces la Ex de la Ez. La A (100ng/ml) aumentó significativamente el efecto de 8-Br-cAMP (1.5 mmol/l) sobre la Act y la Ex (3.2 ± 0.5 veces) de la 17HSD. Con Fo (100ng/ml ó 200 ng/ml), la A no afectó ni la Act ni la Ex de la 17HSD tipo 1. La Ex de la P450arom inducida por 8-Br-cAMP fue incrementada 3.4 ± 0.7 veces por A (100 ng/ml), excepto en presencia de Fo. La Ac y la Ex de las Ez no fueron afectadas por Fo ó In solas. Los resultados apoyan el rol de A como factor regulador de la síntesis de estrógenos en CG inmaduras y el papel de Fo como proteína moduladora de la A. El mecanismo de acción de A sobre Ex de la 17HSD tipo 1 utilizaría una vía complementaria a la vía de AMPc.

**449. Inhibinas y FSH en el desarrollo temprano de un tumor ovárico intraesplénico:** P Hockl<sup>1</sup>, A Chamson-Reig<sup>1</sup>, E Soriano<sup>1</sup>, S Campo<sup>2</sup>, M Ballerini<sup>2</sup>, N Groome<sup>3</sup>, C Libertun<sup>1</sup>, V Lux-Lantos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>IByME-CONICET; <sup>2</sup>CEDIE Hospital R. Gutiérrez, Buenos Aires; <sup>3</sup>Oxford Brookes University, UK

El injerto de un ovario en el bazo de una rata en estro ovariectomizada desarrolla un tumor lúteo (luteoma: L), gonadotrofinas-dependiente, en el que hay una disociación entre LH y FSH y en el que sugerimos un papel de las inhibinas (Life Sci 57:291:95). Aquí estudiamos el desarrollo de L y su relación con LH, FSH y las inhibinas A y B. El día del injerto se tomó sangre yugular y el ovario contralateral (Control: C). Las ratas se

sacrificaron en las primeras 6 semanas (L1-L6) determinándose el peso tumoral y su contenido de inhibinas y los niveles séricos de LH, FSH e inhibinas A y B. El tamaño de los tumores aumentó con el tiempo. LH subió hasta la semana 5, luego cayó parcialmente (LH, ng/ml: C: 0.5±0.1; L1: 6.6±1.7; L5: 26.3 ±6.2; L6: 10.4±2.2, p<0.05). FSH alcanzó el máximo en las semanas 1 y 2, luego descendió hasta valores basales en las semanas 3-5 y nuevamente se incrementó en la 6a (FSH, ng/ml: C: 2.5±0.2; L1: 18.4±2.5; L3: 4.6±0.6; L6: 9.37± 2.2, p<0.05). Las inhibinas A y B, en suero, siguieron un patrón similar aumentando marcadamente en las semanas 3-5 y cayendo en la 6a (Inhibina A, pg/ml: C: 302±22; L1: 375±180; L3: 975±108; L6: 533±179, p<0.05). Los niveles de las inhibinas séricas correlacionaron negativamente con los niveles de FSH de L1-L6 (Inhibina A: r: 0.94, p<0.01, Inhibina B: r: 0.95, p<0.01). En el tumor la inhibina A aumento la semana 3 en paralelo al suero. Concluimos que durante las primeras semanas, L secreta las inhibinas A y B y que éstas regularían la secreción de FSH. CONICET-UBA.

**450. Inhibidor de la tiroperoxidasa en cultivos celulares en monocapa.** L Krawiec, L Bocanera, P Aphalo, G Juvenal, M Pisarev, M Agote

*CNEA y CONICET, Buenos Aires*

Resultados previos del laboratorio, demostraron la presencia, en el citosol de cultivos primarios de tiroides bovinas, de un inhibidor termoestable de la tiroperoxidasa (TPO). Los niveles de este factor aumentan en relación inversa a la disminución de la organificación del yodo en dichos cultivos. Se continuaron los estudios para caracterizar mejor este factor inhibitorio. Se trabajó con TPO extraída con tritón X-100 del precipitado de 105.000xg de tiroides bovinas frescas. La actividad de la enzima se midió por iodación de tirosina. El agregado a folículos libres (FL) de este factor, presente en el sobrenadante (SN) de 105.000xg, inhibe la organificación, explicando así, la ausencia de esta función en los cultivos celulares tiroideos (FL: 7500 ± 657 pmol/mg.pro/h., FL+SN: 305 ± 7,4 pmol/mg.pro/h, p<0.001). Asimismo, demostramos que este factor es dializable, con peso molecular estimado cercano a 2 Kd. Su posible mecanismo de acción sería por interferencia en la incorporación del yodo a la tirosina, dado que la inhibición no se manifiesta en la reacción del guayacol. El inhibidor se encuentra presente en cultivos primarios de tiroides bovinas, porcinas y en la línea establecida de tiroides de rata: FRTL-5. En todos los casos mencionados el modelo de cultivo determina su aparición, ya que se manifiesta en monocapas y no en folículos libres en suspensión (TPO 337±14 pmol l/mg prot/min., TPO+SN monocapa. 75±7, TPO+SN folículos libres 318±33). De los resultados expuestos se puede concluir: 1) que el factor inhibitorio es una molécula de peso menor de 2Kd. 2) actúa interfiriendo con la unión del yodo a la tirosina. 3) el modelo de cultivo determina su presencia. 4) su aparición es independiente de la especie estudiada.

**451. Rol de la vía de la Proteín Kinasa C en el transporte de 2-deoxiglucosa en la línea celular de tiroides de rata FRTL-5.** D Silberschmidt, M Agote, L Bocanera, L Krawiec, G Juvenal, MA Pisarev

*C.N.E.A. y CONICET, Buenos Aires*

Es conocido que en FRTL-5, TSH e insulina estimulan el transporte de 2-deoxiglucosa (DOG) en forma aditiva a tiempos cortos. El objetivo de este trabajo fue determinar si la vía de la Proteína Kinasa C (PKC) está involucrada. El transporte de DOG se determinó incubando los cultivos durante 30' en presencia de <sup>3</sup>H-2-DOG, expresándose los resultados como pmoles DOG/mg prot/30 min. Se incubaron células FRTL-5 con distintas concentraciones (10<sup>-10</sup> a 10<sup>-7</sup> M) de forboi miristato acetato (PMA) (estimulador de PKC) observándose un estímulo en el transporte de DOG. Cuando se estudiaron distintos tiempos de incubación (PMA 10<sup>-7</sup>M), se observó un incremento sostenido hasta las 3 horas (Control: 527 ±169, PMA 3h: 2133 ±266, p<0,01), en tanto que a las 72 horas el estímulo desaparece (PMA 72h: 686±14).

Esta inhibición de la PKC por incubación durante 72 horas con PMA no tuvo efecto sobre el estímulo causado por TSH (TSH: 1170 ± 31, TSH + PMA 72h: 1305±218, ns). Por otra parte la staurosporina (inhibidor de la PKC) revierte totalmente el efecto de la insulina sola (Control: 474±7, insulina: 621±13 p<0,01, insulina + st: 510±34, ns) pero parcialmente el efecto conjunto de la insulina y TSH. Tal como ocurre con la insulina, el PMA tiene un efecto aditivo al estímulo de la TSH a los 180 minutos (Control: 574±88, PMA: 3227±600, TSH: 2930 ±700, PMA+TSH: 6148 ± 1444 ). Estos datos sugieren que el estímulo del transporte de 2-DOG por insulina estaría mediado por la vía de la PKC no así el debido a TSH.

## HEMATOLOGIA

**452. Accion del aluminio sobre celulas progenitoras eritroides.** Graciela Garbossa, Daniela Vittori, Alcira Nesse.

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

Experiencias previas en el laboratorio demostraron que el aluminio (Al) produce inhibición del desarrollo de CFU-E y disminución del hematocrito. El propósito de este trabajo es estudiar la incorporación y utilización de hierro (Fe) a fin de elucidar el efecto del Al sobre el metabolismo del Fe. Ratas Sprague Dawley hembras ingirieron durante 8 meses Al-citrato en el agua de bebida. Al cabo de este tiempo fue encontrada una severa inhibición (67%) del crecimiento de CFU-E con respecto a los animales controles (19 vs. 6 CFU-E/10<sup>3</sup> cél). Se observaron altos niveles de saturación de transferrina con Fe (49-64 %), aumento de la ferremia [3,59 (3,43-4,12) vs. 3,18 (3,10-3,22) mg/l], así como numerosos sideroblastos y hemosiderina en los frotis de médula ósea (m.o.). Células de m.o. estimuladas *in vitro* con eritropoyetina fueron cultivadas 24 h con Al-citrato (50µM), <sup>59</sup>Fe-citrato (35 nCi) y apotransferrina (0.4µM). El contenido de hemoglobina fue medido por espectrofotometría de la reacción con DAF. La captación de <sup>59</sup>Fe no fue modificada por la presencia de Al a pesar de la disminución de 21-31% de la hemoglobinización celular. El aumento de la ferremia y la presencia de hemosiderina en m.o. muestran que los animales no estaban depletados de Fe. El hallazgo conjunto de sideroblastos y de inhibición del desarrollo de CFU-E indicarían que los progenitores eritroides de la médula ósea no pueden utilizar en forma normal el Fe que incorporan.

**453. Efecto del aluminio sobre la incorporación de hierro y la hemoglobinización en células K562.** Gladys Pérez, Graciela Garbossa, Beatriz Sassetti, Cecilia Di Risio, Alcira Nesse.

*Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires*

La sobrecarga de aluminio (Al) provoca alteraciones hematológicas en pacientes en hemodiálisis e individuos con función renal normal. Hemos demostrado que el Al inhibe el desarrollo de CFU-E en células (cél) de médula ósea y la hemoglobinización de cél K562. En estas cél, el receptor para transferrina (RTf) posee similar afinidad por Tf-Fe y por Tf-Al. El objetivo de este trabajo es determinar el efecto de Al sobre la disponibilidad (N°) de RTf y la captación de Fe. Las cél K562 fueron estimuladas 72 h con hemina (H 25 µM) o HO-urea (U 75 µM), con o sin adición de Al-citrato 100 µM y apoTf 0,6 µM. Se realizaron ensayos de binding de <sup>125</sup>I-TfFe a 0°C a distintos tiempos y, a partir de los datos de máxima unión, se calculó el N° RTf. El Al provocó un aumento del N° RTf: en presencia de H (44%) y de U (27%). La incorporación de Fe (cultivos similares, pulso de 24 h con <sup>59</sup>Fe-citrato) no fue modificada significativamente por la presencia de Al. La hemoglobinización (reacción con bencidina) disminuyó entre 10-43% en cél estimuladas con H y entre 20-40% en las estimuladas con U. Estos resultados indican que el aumento de la disponibilidad de RTf ante la presencia de TfAl, sería un mecanismo al que recurren las cél para obtener el Fe necesario en las condiciones de cultivo uti-

lizadas. Por lo tanto, la disminución del % de cél hemoglobinizadas sería el resultado de una interferencia del AI con la utilización del Fe.

**454. Receptor soluble de transferrina (sTfR), su relación con la eritropoyesis.** Carmen Stanganelli, Juana Cabrera, Katia Canalejo, Mónica Aixelá

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

El receptor de transferrina es proporcional a la masa de precursores eritroides y se correlacionaría con el parámetro ferrocinético ETU (Nº de moléculas de Fe unidas a transferrina tomada por receptores tisulares/unidad de tiempo). Nuestro objetivo fue evaluar la eritropoyesis en distintas anemias, a través de la medida del sTfR, y observar su correlación con el ETU y la Tasa de Hemoglobina (THb: g Hb sintetizada/kg de peso corporal/día). Se estudiaron 18 sujetos normales y 29 pacientes con distintos desórdenes hematológicos. En ambos grupos se dosó: ferremia, transferrina, % de saturación por técnica convencional y ferritina, EPO y sTfR (ELISA). A los pacientes se efectuó el estudio eritroferrocinético por técnica convencional. El valor de sTfR del grupo normal fue 18,4±9,7 nmol/l. Se observó su disminución en hipoplasias eritroides (n=5, mediana=5.5 nmol/l; rango: 3.2-14) y su aumento en AH (n=11, mediana=68 nmol/l; rango: 29-110), SMD (n=7, mediana=33 nmol/l; rango: 25-158) y SMP (n=6, mediana=43 nmol/l; rango: 27-60). El sTfR se correlacionó significativamente con el ETU (r=0,72, p<0,001) y con la THb (r=0,70, p<0,001). Se concluye que el sTfR reflejaría la tasa de eritropoyesis y sería un buen parámetro sérico (no invasivo) para monitoreo de la eritropoyesis total, en situaciones donde no puede realizarse el estudio radioisotópico.

**455. Efecto de la suplementación con hierro y su frecuencia, en gestantes.** ML de Portela\*, SH Langini\*, S Fleischman\*, M García#, LB López#, R Guntin#, CR Ortega Soler#

*#Hospital D. Paroissien La Matanza, \*Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA*

Se estudiaron 80 gestantes, clínicamente sanas, desde edad gestacional 16,8±2,7 semanas (To) hasta semana >30 (Tf): G1 y G2 recibieron Fe (fumarato ferroso): 60 mg por día ó cada 3 días, respectivamente; GC, control sin suplementar. A To y Tf se determinó, en sangre entera: Hematocrito (Hto); Hemoglobina (Hb); Protoporfirina Eritrocitaria (PE)(según Piomelli); en suero: ferritina (ELISA). Los valores (X±DE) fueron, To y Tf, respectivamente : Hb (g/dL): GC: 12,5±1,2; 11,9±1,4 (p<0,05); G1: 12,6±1,1; 12,8±1,1; G2: 12,9±0,8; 12,2±1,4; PE (µg/dL glóbulo rojo): GC: 30±18; 43±21 (p<0,01); G1: 24±13; 38±20 (p<0,01); G2: 34±17; 28±24; FERR (ng/mL): GC: 61±53; 11±5 (p<0,01); G1: 46±35; 19±10 (p<0,01); G2: 43±11; 17±19 (p<0,01). Estos resultados evidencian: a) la suplementación con Fe evitó la disminución de Hb; b) la variación de PE dependió de la frecuencia de la dosis; c) los depósitos de Fe disminuyen independientemente de la suplementación y de la frecuencia de administración. Financiado por UBA, subsidio BA 086.

**456. Caracterización molecular de pacientes con Talasemia Mayor.** A Roldán, A Feliu, A Cygler, G Sciucatti, L Chertkoff, M Bonduel

*Hospital de Pediatría J. P. Garrahan, Buenos Aires*

El mayor determinante de la fisiopatología de Talasemia Mayor es el desbalance de cadenas de globina  $\alpha$ /no  $\alpha$ . Este desbalance es el resultado de las alteraciones moleculares presentes en los cluster de  $\alpha$ - y  $\beta$ -globina. En 34 pacientes (30 familias) se estudiaron las mutaciones puntuales más frecuentes del gen  $\beta$  por PCR y ASO o por PCR y digestión con enzimas de restricción. Las mutaciones no frecuentes se analizaron por secuenciación directa, la delección  $\delta\beta$ -Siciliana mediante Gap-PCR

y el cluster  $\alpha$  por Southern blot. Las mutaciones -158  $\Delta\gamma$  y -196  $\Delta\gamma$  se estudiaron por PCR y digestión con XmnI y PCR-ASO, respectivamente. Las frecuencias de las mutaciones en el gen  $\beta$  observadas fueron: C-39: 32.2%, I-110: 25.4%, I-6: 13.6%, I-1: 5.1%,  $\beta$ -87: 5.1%, II-745: 5.1%, II-1: 3.4%,  $\beta$ -101: 1.7%, Fs-6: 1.7%, C-29: 1.7%,  $\delta\beta$ -Sci: 1.7%, Hb Lepore: 1.7%. No se detectaron delecciones en el cluster  $\alpha$ . El alelo -158  $\Delta\gamma$  se observó en heterocigosis en cuatro pacientes, de los cuales dos son hermanos (5.1%). La correlación genotipo-fenotipo fue similar a la observada en otras poblaciones, si bien la presencia de un alelo  $\beta^{**}$  o de la mutación -158  $\Delta\gamma$  no se asoció a cuadros de Talasemia Intermedia en nuestra población, a diferencia de lo observado en otras poblaciones.

**457. Indicadores hemorreológicos de actividad de la artritis reumatoidea.** A Luquita, AM Gennaro<sup>o</sup>, L Urli, A Dominighi ni, MJ Svetaz, R Volpintesta, S Palatnik, M Rasía

*Facultades de Ciencias Médicas y de Ciencias Bioquímicas. UNR.º INTEC-CONICET, UNL*

Los test bioquímicos actualmente utilizados como índices de actividad de la artritis reumatoidea crónica (ARC) no son fidedignos. *Objetivo:* buscar indicadores más reales en la reología eritrocitaria. Se estudiaron 13 mujeres que presentaban en su examen clínico 4 de los 5 criterios de la ARA, 8 inactivas y 5 activas. Entre activos e inactivos se encontró una diferencia significativa en la viscosidad sanguínea relativa ( $\eta_{sp}$ ) (p<0,01) y en la deformabilidad eritrocitaria (DF) (p<0,01). Las variables reológicas no correlacionaron con las bioquímicas. La única causa del aumento de la  $\eta_{sp}$  en los pacientes activos fue la disminución de DF (r=0.59, p<0.05) de lo que concluimos que la hiperviscosidad sanguínea en pacientes con ARC activa, se debe a la menor deformabilidad eritrocitaria. La DF alterada no correlaciona con los índices hematimétricos ni con la fluidez de membrana, pero con la concentración de Inmunoglobulinas (IgG y IgM), aunque no llega a ser significativa, sugiere la posible interacción entre estas proteínas y la superficie eritrocitaria, que deberá ser elucidada en un próximo estudio.

**458. Hiperhomocisteinemia (HHCY) en pacientes anticoagulados.** Irene Quintana<sup>(2)</sup>, Alicia Murúa<sup>(1)</sup>, C Galarza<sup>(1)</sup>, J Janson<sup>(1)</sup>, J Alfie<sup>(1)</sup>, Lucía Kordich<sup>(2)</sup>, M Camera<sup>(1)</sup>

*(1) Sociedad Argentina de Medicina Vascular<sup>(2)</sup>. Laboratorio de Trombosis, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA*

A partir de numerosos estudios observacionales la HHCY ha sido reconocida como un factor de riesgo de enfermedad vascular arterial. En los pacientes bajo tratamiento dicumarínico (ACO), se suele limitar la ingesta de vegetales de hojas verdes pensando en la estabilidad del rango terapéutico, esto podría llevar a una inadvertida disminución de la ingesta de folatos y consecuentemente contribuir a la elevación de HHCY. Para evaluar esta hipótesis, incluimos consecutivamente 20 pacientes ambulatorios bajo ACO crónico y como controles 35 pacientes con enfermedad arterial sintomática. Todos los individuos evaluados fueron mayores de 60 años, sin antecedentes de insuficiencia renal crónica, diagnóstico de hipotiroidismo ni utilización de drogas que pudiesen ser causa de HHCY. Ninguno había presentado eventos vasculares recientes o episodios infecciosos. *Resultados:* Los niveles de HHCY (ELISA) fueron significativamente más elevados, (24.5± 9.8 vs 15± 7.4 µmol/l, P<0.001) y los de folato sérico más bajos (2.6± 0.7 vs 5.4 ± 4.4 ng/ml, p< 0.05) en el grupo de pacientes anticoagulados. La diferencia en el análisis de HHCY se mantuvo excluyendo los pacientes con reemplazos valvulares y analizando exclusivamente a los hombres de cada grupo. No hubo diferencia entre los distintos grupos diagnósticos de pacientes bajo tratamiento ACO. Conclusiones Todos los pacientes ACO presentan HHCY leve a moderada, y esto es parcialmente explicado por menores niveles plasmáticos de ácido fólico.

**459. Valor del coeficiente de variabilidad de la Razón Internacional Normalizada (RIN) en anticoagulación crónica con acenocumarol:** P Casais, S Meschengieser, A Sánchez Luceros, E Bermejo, MA Lazzari

*División Trombosis, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires*

Entre los factores de riesgo de hemorragia que dependen del tratamiento en los pacientes anticoagulados crónicos (P), se identificó la desviación del tiempo de protrombina del rango deseado (variabilidad). Se ha establecido la variabilidad normal de la warfarina y no la del acenocumarol, droga de uso frecuente en nuestro medio y con diferente vida media que la warfarina. El objetivo fue establecer el rango de distribución normal de la variabilidad de una población en tratamiento con acenocumarol y su valor predictivo de hemorragia mayor. Se estudiaron 811 pacientes (P) con un seguimiento de 1963,26 años y 27.321 RIN (población total) entre los que se observaron 47 hemorragias mayores (n=37). Para establecer un nivel "ideal" de variabilidad, se seleccionaron pacientes (n=60) sin ajuste de dosis durante 6 meses como mínimo, por hallarse en rango deseado, y sin complicaciones. La variabilidad media de la población total fue de 0.87 (SD 0.47), la de los que presentaron hemorragia mayor 1.04 (SD 0.74) y la de los controles 0.35 (SD 0.15). Presentaron una variabilidad igual o mayor a 1.47 (percentilo 90) el 30% de los pacientes con hemorragia mayor y el 9% de los que no tuvieron sangrados (p=0.0000). La variabilidad durante la terapia anticoagulante oral puede ser un parámetro útil para identificar a los pacientes en riesgo de hemorragia.

**460. Nuestra experiencia en el diagnóstico de enfermedad de von Willebrand.** Al Woods, A Blanco, AC Kempfer, SS Meschengieser, MA Lazzari

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

La enfermedad de von Willebrand (vWd) es el desorden hemorrágico congénito más frecuente, resultado de un defecto cuali o cuantitativo del factor vWf. Objetivo de este trabajo: mostrar nuestra experiencia en el estudio de esta patología. De 1982 a la actualidad se estudiaron 1730 sujetos (m: 40%; f: 60%). Edades a la consulta: £ 10 a: 24,8%; de 10 a 20: 21,9%; de 20 a 40: 34,8%; + de 40: 18,4%. Según el grupo sanguíneo: O: 71,68%; A: 23,35%; B: 4,2%; AB: 0,77%. Si consideramos que la frecuencia de Grupo O es de 46% en la población general la incidencia de vWd es mayor en sujetos con dicho grupo sanguíneo. Pruebas realizadas: TS, Adh, TTPA, FVIII, vWf, RiCof, multímeros del vWf. Se diagnosticaron: Tipo 1: 95,08%; Tipo 2A: 3,08%; Tipo 2N: 0,46% y Tipo Severo: 1,39%. Frecuencia de síntomas clínicos: 1-equimosis, hematomas: 49,3%; 2-epistaxis: 37,8%; 3-h. ginecológicas: 37,7%; 4-gingivorragia: 29,6%; 5-h. post extracción dentaria: 28,4%; 6-h. post cirugía: 19,9%; 7-h. post parto: 10,8%; 8-hemartrosis: 6%; 9-h. digestiva: 1,3%; 10-otros: (SNC, hematuria, h. retroplacentaria): 3,1%. Pacientes con antecedentes familiares de hemorragia: 55,8%. De 652 mujeres de 12 y 45 años: 11,3% se embarazaron y 7,8% tuvieron abortos espontáneos. Se realizaron 468 pruebas de DDAVP; con buena respuesta: 81,8%, con respuesta inadecuada: 16,02% y no respondieron: 2,13%. La frecuencia y severidad de eventos hemorrágicos fue en orden decreciente: 1) tipo severo y 2N, 2) tipo 2A y 3) tipo 1.

**461. Penetrancia del fenotipo de la enfermedad de von willebrand tipo 1 y 2a.** Al Woods, A Blanco, AC Kempfer, SS Meschengieser, MA Lazzari

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

La enfermedad de von Willebrand (vWd) es el desorden hemorrágico congénito más frecuente. Su detección debe exten-

derse a los familiares directos. Desde 1982 a la actualidad hemos estudiado 389 familias, con un total de 1124 sujetos. Las pruebas realizadas fueron: TS, Adh, TTPA, FVIII, vWf, RiCof. En algunos casos se hicieron multímeros del vWf para mayor precisión del diagnóstico. Se diagnosticó vWd en 684. En los familiares estudiados se hallaron las siguientes pruebas alteradas: TS: 34,54%; Adh: 62,04%; TTPA: 40,23%; VIII: 40,23%. La adhesividad plaquetaria es el test alterado con mayor frecuencia. Analizamos 72 familias con más de 4 miembros estudiados; en 68/72 familias con 331 miembros se diagnosticó vWd tipo 1 en 49,03% de los mismos mientras que en 4/72 familias con 36 miembros se diagnosticó vWd tipo 2A en 91,4% de los integrantes. La probabilidad de que los demás miembros de la familia estén afectados es el doble en el caso de los 2A que en el tipo 1.

**462. Frecuencia de la mutación Arg 91 Gln en la enfermedad de von Willebrand Tipo 2N.** CE Farías, AC Kempfer, GA Carballo, MR Silaf, P Casais, A Woods, S Grosso, MA Lazzari

*Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina y Buenos Aires*

La enfermedad de von Willebrand (vWD) Tipo 2N, es causada por mutaciones en el gen del factor von Willebrand (vWf) que producen una disminución de la capacidad del vWf de unirse al FVIII. Hemos estudiado 29 pacientes previamente diagnosticados como hemofílicos A ó vWD Tipo 1. Utilizamos técnicas convencionales (FVIII, vWf:Ag y RiCof) y un ensayo inmunoenzimático (técnica de Nishino) para evaluar el enlace del vWf al FVIII (E), respecto a un pool de plasmas normales considerado como 100 U/dL. De los 29 pacientes estudiados, 12 presentaron un E disminuido respecto al vWf disponible. Para la detección genotípica del vWD Tipo 2N, el DNA fue extraído de muestras de sangre y los exones 18-20 del gen fueron amplificados por PCR y tratados con enzimas de restricción apropiadas. Ningún paciente (de los 12) presentó la mutación Arg 91 Gln. Dos de 9 pacientes presentaron la mutación Arg 53 Trp. Ninguno de 6 pacientes mostró la mutación His 54 Gln y sólo uno de ellos la mutación Arg 19 Trp. Concluimos que a diferencia de los estudios en Holanda y Francia, en nuestros pacientes la frecuencia de la mutación Arg 91 Gln sería baja, como la encontrada en centros de Israel, Italia y USA.

**463. Comportamiento de los multímeros extragrandes y grandes del factor von Willebrand (vWf) plasmático bajo condiciones de microcirculación.** AC Kempfer, CE Farías, GA Carballo, MR Silaf, S Meschengieser, MA Lazzari

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

La presencia de multímeros extragrandes del vWf en PTT se ha relacionado con el déficit de una proteasa. Su determinación podría ser usada para identificar sujetos con tendencia a PTT latente. En cuatro pacientes con multímeros extragrandes plasmáticos (paciente: A: 51%, B1: 40% y 60 días después B2: 36%, C: 62%, D: 55% y un pool normal: 0%) se estudió la actividad de la proteasa. Dicha actividad se evidencia con la disminución de los multímeros grandes al perfundir plasma a 10.000 s<sup>-1</sup> durante 60 min. En estas condiciones se perfundieron los plasmas de los pacientes y el pool normal. Los multímeros fueron cuantificados por densitometría. Los multímeros grandes y extragrandes luego de la perfusión fueron A: 72%, B1: 53% y B2: 72%, C: 43%, D: 31% y el pool normal: 39% (n=4). La media y desviación estándar de plasma normal perfundido es de 45±11(n=12). Los pacientes C y D tendrían un comportamiento similar al normal. Los pacientes A y B no tienen un comportamiento normal, lo que indicaría deficiencia de la proteasa y se verían beneficiados con el aporte de plasma normal.

**464. Productos de degradación proteolítica de fibronectina (Fn) parcialmente purificada inducen la pérdida de multímeros grandes del factor von Willebrand (vWf) en condiciones**

**semejantes a las de la microcirculación.** AC Kempfer, GA Carballo, CE Farías, MR Silaf, MA Lazzari

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

Encontramos que plasma depletado de Fn (Ps-Fn) por inmunoprecipitación no evidencia la pérdida de los multímeros grandes del vWf sometido a alta fuerza de cizallamiento. El agregado de Fn purificada comercial no muestra dicha pérdida. Considerando la actividad proteolítica latente de Fn, tratamos Fn\* (parcialmente purificada con gelatin-Sepharose) con cathepsina D a pH 3.5. Se ajustó el pH a 7.5 para inactivar la cathepsina D. El producto se sembró en Heparin-Sepharosa, y se realizó una elución escalonada con: 0.1, 0.25 y 0.5 M NaCl obteniéndose tres subproductos: Fn1, Fn2 y Fn3. Dichos sub-productos y la Fn\* dializados se agregaron a Ps-Fn (pH 7.5) y se perfundieron a 10.000 s<sup>-1</sup>, 60 min. El antígeno de Fn (por inmunoelectroforesis con anti-Fn) fue: Fn\*=400%, Fn1=200%, Fn2=25%, Fn3=0%. Los multímeros grandes evaluados por densitometría fueron: Ps=45±11% (n=12), Ps-Fn=90%, Ps-Fn+Fn\*=72%, Ps-Fn+Fn1=36%, Ps-Fn+Fn2=33%, Ps-Fn+Fn3=17%, (n=3). El tratamiento de Fn\* con cathepsina D genera subproductos (reconocidos o no por anti-Fn) que provocan una pérdida de los multímeros grandes del vWf similar a la del plasma normal.

- 465. Utilidad de los sustratos cromogénicos (VIII<sub>sc</sub>) en la identificación de inhibidores anti-factor VIII (a-fVIII) e inhibidor lúpico (LA).** Alicia Blanco, Andrea Peirano, Silvia Grosso, Laura Gennari, María Lazzari

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

Nos propusimos desarrollar un sistema de detección de a-fVIII sin interferencias por LA. Medimos el VIII<sub>sc</sub> en diluciones progresivas del paciente (P), del normal (N) y de la mezcla de ambos (P+N) y el VIII<sub>sc</sub> post-incubación a 37°C, control: mezcla de P y N incubados separadamente (P+N); obteniéndose rectas paralelas al normal. Los resultados se expresaron como índice de inhibición respecto al N (li) o de potenciación (Ip<sub>37</sub>) respecto a la mezcla P+N. Evaluamos pacientes con a-fVIII (control positivo) (n=6) (3/6 hemofílicos), con LA (control negativo) (n=6) y con evidencias clínicas y de laboratorio de a-fVIII+LA (n=2). La inhibición por a-fVIII (li:5.1-200), fue potenciada a 37°C (Ip<sub>37</sub>:27-5000). No hubo inhibición por LA (li:0-7.2; Ip<sub>37</sub>:0-4.2) pero sí por a-fVIII+LA (li:9.8-21), efecto potenciado a 37°C (Ip<sub>37</sub>:50-100). Los resultados muestran la posibilidad de detectar a-fVIII sin interferencias por LA, mediante VIII<sub>sc</sub>, lo cual implica un avance diagnóstico de importancia.

- 466. La neutralización con fosfolípidos del APTT (PNP) no define comportamiento clínico en pacientes con inhibidor lúpico (IL).** Laura Gennari, Alicia Blanco, Silvia Grosso, Fabiana Alberto, Julieta Salviú, Claudia Varela, María Lazzari.

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

Evaluamos si APTT↑/PNP+ en IL es un marcador de comportamiento clínico. Se incluyeron 89 IL (según criterios SSC-ISTH basados en APTT y/o dRVVT, corrección con normal y neutralización con fosfolípidos) con trombosis (V:38; A:33) u otras patologías (18); 47/89 tenían APTT ↑/PNP+. En 25/89 se estudió la fibrinólisis (pre y post isquemia) y en 32/89 parámetros de trombofilia (APCR, PC, PS, ATIII). No encontramos diferencias (p>0,1) en la prevalencia (PNP+ 74% vs PNP- 86%) ni en el tipo de trombosis (PNP+ A:49%, V:51%; PNP- A:44%, V:55%). En ambos grupos, las anormalidades fueron semejantes (p>0,1) (Fibrinólisis PNP+:7/16; PNP-:8/18; Trombofilia PNP+:11/16; PNP-:8/20). En 42/42 PNP-, los antifosfolípidos (APA) fueron negativos; 9/47 PNP+ presentaron APA+, en 5 PNP+/APA+ se analizó la APCR, hallándose 4 APCR adquiridas y 1 FV<sub>I</sub> en ningún otro

grupo observamos APCR adquirida. La media del tiempo Russell diluido (dRVVT) fue mayor (p<0,01) en PNP+ (34,2) que en PNP- (20,6). Excepto el dRVVT, no observamos diferencias entre PNP+ y PNP- que justifiquen la existencia de poblaciones diferentes.

- 467. Perfil clínico de pacientes con disminución de factor XIII<sub>A</sub>.** Claudia Varela, Alicia Blanco, Julieta Salviú, Susana Meschengieser, María Lazzari.

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

El factor XIII (2XIII<sub>A</sub>:2XIII<sub>B</sub>) es responsable de la unión intermolecular ε-(γ-glutamil)lisina, siendo A la subunidad catalítica. La deficiencia severa de XIII<sub>A</sub> (<5%) se asocia a sangrado (sistema nervioso central, cordón umbilical); en algunos pacientes con XIII<sub>A</sub>≥5% o en supuestos heterocigotas se ha reportado sangrado moderado o severo. Ante el hallazgo de XIII<sub>A</sub> disminuido (XIII<sub>A</sub>) (32,4±3,2; 24-43) en 5 pacientes, de los cuales 2 tenían epistaxis y 2 sangrados post-quirúrgicos alejados, nos preguntamos si la disminución de XIII<sub>A</sub> podría relacionarse con las manifestaciones clínicas. Para ello evaluamos además 8 individuos con XIII<sub>A</sub> normal (XIII<sub>AN</sub>) (94,7±7,4; 76-130) y valores comparables (p>0,1) del resto de los parámetros analizados (TP, APTT, IVIII, vWAg, RiCof, TS y adhesividad plaquetaria). La prevalencia de sangrado en XIII<sub>AN</sub> (4/5) fue significativamente mayor (p=0,006993; test de Fisher) al observado en XIII<sub>AN</sub> (0/8); solo 1 de las mujeres con XIII<sub>AN</sub> tenía gestas previas (2/2 abortos). Estos resultados sugieren una posible asociación entre la disminución de XIII<sub>A</sub> (24-43%) y las complicaciones hemorrágicas.

## CARDIOVASCULAR

- 468. Asociación entre reología sanguínea y niveles sanguíneos de triglicéridos en ratas.** G Hernández\*\*, MC Gayol\*, M Rasia\*\*

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

Se sabe que la reología sanguínea está alterada en las hiperlipoproteinemias primarias o secundarias tal como la consecuente de la diabetes mellitus. En el presente trabajo, utilizando una línea especial de ratas diabéticas y obesas endocríadas en la Fac. de Cs. Médicas IIme/Fmβ y sus controles normales IIme/Fmα, se intenta dilucidar el papel de los lípidos en las alteraciones reológicas. Estudiando la viscosidad sanguínea absoluta (con un viscosímetro cono-plato) versus triglicéridos séricos (TG) (por método enzimático) obtuvimos una correlación positiva (rs= 0,575, p<0,01). Intentamos dilucidar el papel de la viscosidad plasmática (h<sub>p</sub>) y de los glóbulos rojos (GR) en esta interacción. La viscosidad sanguínea relativa (viscosidad absoluta/h<sub>p</sub>, índice que destaca el papel de los GR en la viscosidad absoluta) correlacionó positivamente con los TG (rs= 0,69, p<0,01) demostrando la responsabilidad eritrocitaria. En cambio la viscosidad plasmática correlacionó negativamente (rs= -0,567, p<0,01). La relación entre h<sub>p</sub> y TG merece un estudio ulterior, ya que si bien la hipertrigliceridemia alimentaria aguda no causa cambios de h<sub>p</sub>, los TG son transportados por las lipoproteínas VLDL que por su tamaño molecular deberían estar entre las proteínas que elevan el valor de viscosidad plasmática.

- 469. Fosforilación de Fosfolamban (PHL) y relajación del músculo liso vascular.** Matilde Said, L Vittone, C Mundiña, G Rinaldi, GCh de Cingolani, A Mattiazzi

*Centro de Investigaciones Cardiovasculares y Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata*

Experimentos previos demostraron la correlación entre la fosforilación de PHL por nitroprusiato y la relajación del músculo

liso vascular. (Ann. NY Acad. Sci. 853:292-295,1998). En el presente trabajo se usaron anticuerpos específicos para PHL y para PHL fosforilada en Ser<sup>16</sup> a fin de dilucidar el efecto de intervenciones que aumentan el AMPc en la fosforilación de PHL y su posible correlación con la relajación mecánica en aortas de gato previamente contracturadas con CIK 80mM. Isoproterenol (Iso 1µm) no tuvo efecto en la fosforilación de PHL ni en la relajación. Forskolin (FK 50µM) aumentó la fosforilación de Ser<sup>16</sup> en 185 ± 23% (n=8) y disminuyó la contractura (efecto relajante) en 64 ± 9% de 3,2 ± 0,7 a 1,1 ± 0,4gr. En presencia del inhibidor de PKA H-89 (5µM), FK produjo un aumento similar en la fosforilación de Ser<sup>16</sup> (153 ± 19%) (n=6) en tanto que el efecto relajante fue de un 21 ± 2%. Los resultados sugieren que: I) El efecto relajante de FK podría estar parcialmente mediado por la fosforilación de PHL en Ser<sup>16</sup>, independiente de PKA. II) La falta de respuesta al Iso radica en pasos previos a la formación de AMPc.

**470. Relación entre los cambios de la motilidad parietal luego de un estímulo inotrópico y las características anatómicas de la circulación coronaria en el laboratorio de cateterismo.** C Rojas Matas, AD Fernández, Griselda Antonelli, M Montoya, J Gabay, D Berrocal, R J Gelpi, Liliana Grinfeld

*Servicio de Hemodinamia, Hospital Italiano de Buenos Aires; Laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, UBA*

El objetivo fue evaluar la relación entre las características anatómicas de la circulación coronaria, y los cambios en la motilidad parietal regional en respuesta a una intervención farmacológica (IF), mediante el análisis cuantitativo de la motilidad en el ventriculograma (VTG). Se incluyeron 19 pacientes (P) que presentaban clínica y/o estudios no invasivos que demuestren isquemia miocárdica. Se realizó cinecoronariografía y VTG Basal y luego de IF con dobutamina según protocolo de ecostress. Los VTG fueron analizados en busca de cambios en la motilidad regional utilizando el método de análisis cuantitativo Slager en donde la motilidad parietal se expresa como contribución regional a la fracción de eyección total. (X ± Error standard) De los P analizados 5 (26.3%) no presentaban lesiones coronarias, 11 (57.8%) presentaban lesión en la Descendente Anterior (DA), 6 (31.5%) en la Circunfleja (Cx), y 6 (31.5%) en la Coronaria Derecha (CD); 7 (36.8%) presentaron angina y cambios del ST intraestudio y 2 (10.5%) presentaron solo cambios del ST. Los resultados están expresados como Basal vs. IF para tres áreas diferentes del ventrículo izquierdo. Grupo de P con coronarias normales: anteroapical 12.0±8.6% vs. 12.1±9.9%; anterolateral 14.0±1.7% vs. 16.0±2.4% inferoposterior 15.4±7.1% vs. 18.1±7.0% (p=NS). Grupo de P con lesiones coronarias: DA: anteroapical 11.0±8.1% vs. 8.6±7.5% (p=0.02); Cx: anterolateral 12.5±4.1% vs. 8.6±5.2% (p=0.04); CD: inferoposterior 17.9±6.4% vs. 13.5±9.5% (p=0.06). Se concluye que 1) A pesar que el número de pacientes es pequeño la detección de isquemia fue significativa en dos de las tres áreas analizadas y con tendencia a la significación en la tercera. 2) Este nuevo método es una herramienta útil para el desarrollo de nuevas líneas de investigación.

**471. Factores hemorreológicos y terapia hormonal de reemplazo (THR) en mujeres menopáusicas.** Ml Spengler, G Mengarelli, G Gofí, M Bravo Luna, M Rasía

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

El uso de estrógenos y progestágenos, en mujeres menopáusicas, se asocia con la disminución de la morbimortalidad cardiovascular. *Objetivo:* Estudiar la incidencia de THR sobre los factores hemorreológicos, los hematimétricos, el perfil lipídico y la presión arterial. Se estudiaron 32 mujeres menopáusicas sometidas a THR. *Métodos:* viscosidad sanguínea ( $\eta_s$ ) y viscosidad plasmática ( $\eta_p$ ) con viscosímetro cono-plato; índice de rigidez eritrocitaria (IR) por filtración; índices hematimétricos, concentra-

ción de fibrinógeno, colesterol, HDL, LDL y triglicéridos por los métodos clásicos. Resultados: la terapia produjo en ambas condiciones una disminución de la  $\eta_s$  a distintas velocidades de cizallamiento (shear rate) (230 s<sup>-1</sup> y 115 s<sup>-1</sup>) (p<0.01), acompañada de una disminución significativa en  $\eta_p$  (p<0.01), de la IR (p<0.01) y del fibrinógeno plasmático (p<0.01). Además provocó un aumento en HDL (p<0.01) conjuntamente con una tendencia a la disminución de triglicéridos (p=0.08). Es importante destacar que el tratamiento no produjo modificaciones del peso corporal, de la presión arterial ni de los índices hematimétricos estudiados. Conclusión: la THR mejora la reología sanguínea y el perfil lipídico, factores que contribuyen a disminuir el riesgo cardiovascular.

**472. Comportamiento del Fibrinógeno Plasmático en la enfermedad isquémica vascular** M Moya, V Campana, A Gavotto, L Spitale, J Palma

*Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.*

El Fibrinógeno Plasmático (FP) participaría en la disfunción endotelial, lesión inicial en la aterogénesis. Se estudió el comportamiento de Fibrinógeno, Colesterol(C), Triglicéridos(T) y Corticosterona en plasma y las probables lesiones anatomopatológicas en pared de aorta, en ratas sometidas a estrés crónico, injurias múltiples y dieta hipergrasa (DH). El estrés por inmovilización y las 4 injurias (laparotomías) se realizaron una vez por semana, la DH fue: 1,5ml aceite Oliva, 40mg Colesterol y 8 mg Vit.D2 por rata/día/vía oral durante 30 días. El FP (mg/100ml) presentó diferencias estadísticamente significativas entre lote control(a) (206±3.98) y el injuriado(d) (292.15±12.10) y los injuriados + estrés (c) (281.55±17.17) (p<0.01), entre a y el grupo injuriado + DH + estrés (b) (359.07±10.84)(p<0.001). C y T no mostraron diferencias significativas. Los incrementos de FP asociados a la denudación focal del endotelio de Aorta, reflejarían la disfunción endotelial inicial y la actividad inflamatoria focal.

**473. Propiedades dinámicas de las membranas miocárdicas en la infección con *Trypanosoma cruzi*.** J Enders, R Fernández, C Matas, W Rivarola, P Paglini, J Palma

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

Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que ratones albinos suizos inoculados con 7·10<sup>4</sup> tripomastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuen, desarrollan una infección aguda con severas lesiones miocárdicas que modifican la respuesta farmacológica a los agonistas y antagonistas de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos. El presente trabajo analiza en este modelo experimental la relación entre las propiedades dinámicas de las membranas miocárdicas y la función de los receptores  $\beta$ -cardíacos y alteraciones histopatológicas. Las determinaciones de afinidad y densidad de los receptores  $\beta$ -cardíacos fueron efectuadas con dihidroalprenolol tritiado y la fluidez de membrana se determinó por anisotropía de emisión de la fluorescencia del DPH (1,6-diphenyl 1,3,5-hexatriene) tanto en el grupo control como en el infectado. Los valores de afinidad en ambos grupos fueron similares, mientras que la densidad del grupo control fue mayor (73,64 ± 2,19 fmol/mg.prot) que la de los infectados (49,85 ± 3,76 fmol/mg.prot) (p<0,001). La anisotropía del grupo con Chagas agudo fue mayor (0,183 ± 0,003) que en el grupo control (0,117 ± 0,008) (p<0,05). La histopatología del grupo infectado se caracterizó por intenso infiltrado inflamatorio con nidos de amastigotes. Nuestros resultados muestran que las alteraciones de los receptores y el daño tisular se acompaña con una disminución en la fluidez de la membrana miocárdica, lo cual podría explicar en parte la disfunción cardíaca observada en la infección aguda. Asistencia Técnica: Fernando Fuentes y Pablo Dutto.

**474. Compliance arterial y microalbuminuria en hipertensión esencial.** Jorge Toblli, C Bellido, O Iavicoli, M Costa, P Forcada

*Hospital Alemán y Hospital de Clínicas, Buenos Aires*

En la actualidad se reconoce a la velocidad de la onda de pulso (VOP) como un indicador de compliance arterial (CA) así como a la microalbuminuria un marcador de lesión de órgano blanco en hipertensión arterial. Con los objetivos de: 1) determinar en pacientes hipertensos esenciales la relación entre la excreción urinaria de albúmina (EUA) y la CA y 2) el efecto de un IECA en relación a estas dos variables, se realizó este estudio. Diez pacientes hipertensos esenciales sin tratamiento previo (7 muj. y 3 hom.), de  $53,7 \pm 10,1$  años, recibieron un IECA (perindopril  $4,3 \pm 2,9$  mg/día) durante 6 meses. Se determinó en el período basal (PB) y al 6to. mes: 1) Presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD); 2) EUA (por nefelometría); 3) VOP, con un equipo computarizado (COMPLIOR®). Resultados (media  $\pm$  DS), PB vs. 6to. mes: 1) PAS (mmHg)  $158,3 \pm 11,2$  vs.  $134,5 \pm 8,8$  ( $p < 0,001$ ); 2) PAD (mmHg)  $99,5 \pm 6,5$  vs.  $85,3 \pm 5,6$  ( $p < 0,001$ ); 3) EUA (mg/día)  $17,2 \pm 6,1$  vs.  $9,1 \pm 4,3$  ( $p < 0,01$ ); 4) VOP (m/seg)  $12,1 \pm 2$  vs.  $10,2 \pm 1,7$  ( $p < 0,05$ ). Se observó una alta correlación positiva entre la EUA y la VOP en el PB ( $r = 0,7404$ ;  $p = 0,0143$ ) y al 6to. mes ( $r = 0,9576$ ;  $p < 0,0001$ ), así como entre los delta (6to. mes- PB) de VOP y EUA ( $r = 0,7506$   $p < 0,0124$ ). Estos resultados sugieren que: 1) la CA se correlacionaría con la EUA en pacientes hipertensos, 2) el IECA actuaría sobre ambas variables en forma homogénea.

- 475. Peso al nacer y presión arterial en la adolescencia.** T Fraix, R Ferrera, N Pitueli, M Corbera, M Turco, I Rosillo, S Lioi, D Caferri, B Tamagno\*.

*Consultorio Cardiología Pediátrica, Hospital Centenario; Cátedra de Química Análisis Clínica, Facultad de Ciencias Bioquímicas, UNR, Rosario*

La búsqueda de un mecanismo etiológico subyacente en la hipertensión arterial esencial ha motivado multiplicidad de hipótesis fisiopatológicas. El sobrepeso de los hipertensos ha sido implicado en relación a la resistencia a la insulina. Por lo tanto intentamos relacionar el peso al nacer con la presión arterial de 288 adolescentes sanos de 15 a 18 años. Aplicando la prueba de  $\chi^2$  y utilizando criterios de corte para grupos de mayor y menor peso, que se muestran en la tabla siguiente, no se mostraron diferencias significativas.

Peso	Tensión sistólica		Totales
	$\leq 120$ mm	$> 120$ mm	
<3 Kg	66	5	71
$\geq 3$ Kg	201	16	217
	267	21	288

Luego, el peso al nacer no influiría en la presión arterial.

- 476. El péptido natriurético tipo B (hBNP-32) como marcador de alteración cardíaca temprana en la enfermedad de Chagas.** S Auger\*, J Scaglione, Ana Puyó, H Dupuy, J Storino, Adriana Donoso, B Fernández, A de Boldo

*Cátedras de Biología Celular e Histología y Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; \*Hospital Santojani, Buenos Aires*

En Argentina la enfermedad de Chagas es una parasitosis de larga duración que se caracteriza por desarrollar cardiomiopatía a largo plazo. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el comportamiento de los péptidos natriuréticos en diferentes estadios de la enfermedad. Se estudiaron 33 pacientes chagásicos (11 asintomáticos, 10 con arritmias y 12 con cardiomiopatía), 8 controles y 6 pacientes con arritmia y 9 con cardiomiopatía no chagásicos. Se determinaron los niveles plasmáticos del factor natriurético atrial (ANF 99-126 y 1-30) y de hBNP-32 por RIA. El hBNP-32 se encontró aumentado en los pacientes con Chagas asintomáticos con respecto a los controles ( $5,57 \pm 0,48$  vs  $2,64 \pm 0,35$  pg/ml,  $p < 0,001$ ) y en los pacientes con arritmias cha-

gásicos con respecto a los que presentaban arritmia no chagásicos ( $15,81 \pm 3,92$  vs  $4,05 \pm 1,19$  pg/ml,  $p < 0,04$ ); los pacientes con cardiomiopatía chagásicos y no chagásicos mostraron niveles similares de hBNP-32. No hubo diferencias entre las concentraciones plasmáticas de ANF (99-126) y (1-30) al comparar los mismos grupos. En conclusión, el hBNP-32 plasmático permitiría detectar alteraciones cardíacas producidas por el Chagas antes de la aparición de manifestaciones clínicas de la enfermedad.

- 477. Niveles de fibrinógeno plasmático en la etapa aguda de la enfermedad de Chagas experimental.** M Fantino, A Zamora, C Tulián, R Fernández, W Rivarola, J Enders, J Palma, P Paglini

*Cátedra de Física Biomédica, Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba*

El perfil de alto riesgo en la enfermedad de Chagas se caracteriza por lesiones de fibrosis extensa, miocitólisis y daño vascular que modifican la síntesis a nivel del endotelio y del músculo liso vascular. Siendo el fibrinógeno un factor hematológico que está asociado a las cardiopatías con compromiso microvascular, el objetivo del trabajo realizado fue estudiar si las alteraciones morfológicas observadas en la etapa aguda de la enfermedad de Chagas experimental se acompaña con cambios en los niveles del fibrinógeno plasmático. Se utilizaron ratones albinos suizos machos de 3 meses de edad como controles, e inoculados con  $6,8 \cdot 10^4$  tripomastigotes de la cepa Tulahuen para producir la infección aguda. La determinación del fibrinógeno se realizó a los 12 días posteriores a la infección al igual que el estudio histopatológico. El valor de fibrinógeno en el grupo con infección aguda ( $344,5 \pm 13,4$  mg/dl) fue mayor que en el grupo control ( $283,6 \pm 8,9$  mg/dl) ( $p < 0,05$ ). Esto está relacionado con un intenso infiltrado inflamatorio linfomonocitario, e infiltrados mononucleares perivasculares observados en los extendidos de tejido miocárdico del grupo infectado. Podríamos concluir que, al igual que en otras miocardiopatías, la injuria provocada por la infección con *T. cruzi* produce hiperfibrinogemia.

- 478. Expresión de Colágeno III en miocardio de rata diabética.** Jorge Toblli, I Stella, C Nyberg, L Ferder, F Insera

*Laboratorio de Medicina Experimental, Hospital Alemán & CIMAE, Buenos Aires*

La disfunción del miocardio (MC) es determinante en la morbimortalidad de pacientes con diabetes mellitus (DM). El objetivo de este estudio fue valorar cambios fibroticos iniciales, expresados por el depósito de colágeno tipo III (COL III), en MC de rata con DM por Streptozotocina (STZ). Se utilizaron machos adultos Sprague-Dawley (250-300g) en dos grupos. G1 (n=12) Control, G2 (n= 12) DM. Ambos grupos con alimento standard y agua común "ad libitum". El G2 recibió única dosis de STZ 65mg/kg/ intraperitoneal, y el G1 equivalente de vehículo. Mensualmente se controló la glucemia (GLU) y ningún animal recibió insulina. Al finalizar el experimento (6 meses) se efectuó estudio anatomopatológico del MC. Las muestras fueron procesadas para m. óptica e inmunomarcación con monoclonal anti-COL III. Se evaluó en tejido MC la expresión de COL III según score: 0=neg, 1= lev, 2= mod, 3= sev, 4= muy sev. Resultados ( $x \pm$  SD) GLU (mg/dl) G1=  $136,6 \pm 14,4$  G2=  $688,6 \pm 118$  ( $p < 0,001$ ). COL III, G1=  $0,08 \pm 0,29$  G2=  $2,5 \pm 1,17$  ( $p < 0,001$ ). Se observó una correlación (Pearson) positiva y muy significativa entre las cifras de GLU y el score de COL III en MC ( $r = 0,9155$ ; IC95% 0,7196 a 0,9764,  $p < 0,001$ ). Estos datos sugieren que la presencia de COL III en MC podría estar relacionada con el mal control metabólico de la DM.

- 479. La fase de recuperación parcial sistólica transitoria al inicio de la reperfusión en el miocardio «Atontado» se acompaña de alteraciones diastólicas.** G.E. González, R.J. Gelpi, Celina Morales, M. Rodríguez, O. Scapin.

Laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UBA; Grupo de Estudios Multicéntricos en Argentina (GEMA), Buenos Aires

La disfunción postisquémica ("Miocardio Atontado") incluye un período de recuperación parcial transitoria de la función sistólica al inicio de la reperfusión (PRPTS). El objetivo del trabajo fue estudiar cambios en la relajación isovolumétrica y en la rigidez diastólica durante el PRPTS. Se utilizaron corazones aislados isovolumétricos de conejo (n=12) perfundidos según la técnica de Langendorff. Los mismos fueron sometidos, luego de un período de estabilización, a 15 min de isquemia global. Desde el comienzo de la reperfusión se tomaron registros de presión ventricular y su derivada cada 10 seg hasta completar los 2 min de registro y luego a los 5 min. Se analizó el comportamiento de la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI, mmHg), la máxima velocidad de ascenso de la presión ventricular ( $+dP/dt_{max}$ , mmHg/seg), la presión diastólica final (PDFVI, mmHg; rigidez diastólica) y el tiempo de caída de la PDVI al 50 % de su valor ( $t_{1/2}$ , mseg.).

	C	30seg	1min	2min	5 min
PDVI	100±2*	25±4†	67±4 †	52±2†	52±3†
+dP/dt <sub>max</sub>	753±21*	179±32†	564±52†	373±22†	375±23†
PDFVI	9±1*	13±1†	14±2†	18±2†	19±2†
t <sub>1/2</sub>	49±3*	45±4*	60±4†	62±2†	47±2*

En nuestras condiciones experimentales el PRPTS se acompaña de aumento en la rigidez diastólica y alteraciones lisitrópicas.

X ± ES, \*: P < 0.05 vs 1min; †: P < 0.05 vs. C.

## INFECTOLOGIA

### 480. Efecto del aceite de pescado sobre la infección herpética ocular. María C Courrèges, F Benencia, AJ Monserrat

Centro de Patología Experimental, Facultad de Medicina, UBA y Laboratorio de Inmunoquímica, F.C.E. y N., UBA

Grupos de 10 ratones Balb/c machos y hembras de 4 semanas de edad, sometidos durante 15 días a alimentación con 20% de aceite de maíz (control) ó 20% de aceite de pescado (tratados), fueron infectados por escarificación de la superficie ocular con 10<sup>6</sup> UFP de HSV-1. Los animales continuaron sometidos a las mismas dietas durante los quince días postinfección evaluándose a los 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 días los signos clínicos de la enfermedad. Transcurrido dicho período, se sacrificaron los animales y se estudió la funcionalidad de células peritoneales adherentes (CPA) y la respuesta proliferativa de linfocitos de bazo. Los resultados obtenidos indican que los ratones alimentados con dieta con aceite de pescado presentan signos de enfermedad antes que sus respectivos controles y desarrollan lesiones más severas. No existen diferencias significativas en la opsoneritofagocitosis y la capacidad de reducir NBT de CPA obtenidas de ambos grupos experimentales. La proliferación de linfocitos estimulada por Con A o LPS se halla aumentada en las células provenientes del grupo tratado respecto del control (p<0,005). Teniendo en cuenta que los linfocitos parecen jugar un papel importante en la patogenia de la enfermedad herpética ocular, los resultados obtenidos indicarían que la exacerbación de la enfermedad podría deberse a un incremento de la respuesta inmune inducido por la dieta rica en pescado.

### 481. Progresión intracelular de virus polioma por microtúbulos. N Sanjuan, J Otero.

Laboratorio de Patología Experimental, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Los mecanismos de migración intracelular y de pasaje de célula a célula de los virus carentes de envoltura son muy poco

conocidos. El objeto de este trabajo fue estudiar la progresión de la infección intracelular por Polioma, que es un prototipo de virus desnudo. Se infectaron monocapas de células NIH-3T3 cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio con la cepa PTA de virus Polioma, usando una multiplicidad de infección de 10 ufp/célula. Otros cultivos fueron tratados con Colchicina o Nocodazol (inhibidores de los microtúbulos) o Citocalasina B (inhibidor de Actina), antes de ser infectados con Polioma. En los tiempos 0, 1 y 2 días post-infección (pi) se realizó inmunofluorescencia doble, contra antígenos estructurales de Polioma y contra Tubulina o Actina. En los cultivos no tratados y en los tratados con Citocalasina B se observaron antígenos de Polioma en el núcleo a los 2 días pi. En cambio, las células tratadas con inhibidores de microtúbulos antes de la infección no mostraron antígenos virales. Por microscopía electrónica se observaron virus Polioma adheridos a extremos libres de microtúbulos, y se demostró la unión entre Polioma y Tubulina por coimmunoprecipitación. Se concluye que Polioma avanza hacia el núcleo celular asociado al sistema de microtúbulos.

### 482. Progresión de la infección de virus polioma en el ratón: los macrófagos como blanco de replicación viral. N. Sanjuan, Vanina Kanoore-Edul, Ana Cagnoni.

Laboratorio de Patología Experimental, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, UBA.

Los virus Polioma pueden replicar y producir neoplasias en ratones. El propósito de este trabajo fue detectar los sitios de amplificación de Polioma durante la fase aguda de la infección. Se inocularon por vía intranasal o intraperitoneal ratones C3H BiDa neonatos con 10<sup>5</sup> ufp de la cepa PTA. Entre los 3 y los 12 días post-infección (pi) se practicaron necropsias completas, y la presencia de antígenos de Polioma se detectó por inmunoperoxidasa en cortes histológicos. Se observó que el virus replica en macrófagos alveolares de pulmón, peritoneales y de médula ósea. Para comprobar este resultado, se cultivaron e infectaron in vitro macrófagos esplénicos, peritoneales y alveolares, caracterizados por la presencia del antígeno MAC-1 y por capacidad fagocítica. Se observó un aumento progresivo de antígenos de Polioma entre los días 0 y 3 pi por Western blot sobre proteínas totales separadas por SDS-PAGE, y por inmunoperoxidasa, y se recuperó virus infectivo. Se concluye que Polioma es capaz de replicar en macrófagos del ratón, y que, probablemente, el sistema mononuclear fagocítico sea un sitio importante de la amplificación del virus.

### 483. Aislamiento del virus Lechiguanas asociado con síndrome pulmonar por hantavirus (SPH) en Argentina. S Levis, N Pini, G Calderón, J García, D Enria.

INEVH Dr. J. Maiztegui, ANLIS, Pergamino

Recientemente hemos reportado la existencia de 6 nuevos genotipos de hantavirus en Argentina. El virus Lechiguanas fue detectado en casos de SPH y roedores *Oligoryzomys flavescens* de Sta. Fé y Bs. As. Se presenta el aislamiento del virus Lechiguanas, primer hantavirus aislado en Argentina, a partir de sangre de pacientes con SPH y de pulmón de *O. flavescens* ELISA y RT-PCR positivos de dicha región mediante: a) Inoculación directa de células Vero E6; b) Inoculación en *O. flavescens* de bioterio, y posterior co-cultivo en VeroE6. La detección de antígeno viral en las células infectadas se realizó mediante inmunofluorescencia (IF). Los intentos de aislamiento mediante inoculación directa en Vero E6 fueron negativos. Suspensión de pulmón de 4 roedores se inocularon en *O. flavescens*. En tres de ellos se confirmó la presencia de ácido nucleico mediante RT-PCR de pulmón en los 3 pasajes realizados. En un solo caso se logró la adaptación a Vero E6. En el pasaje 5º se observaron inclusiones intracitoplasmáticas por IF en el 10% de las células, y 100% al cabo de 2 pasajes. Las secuencias de un fragmento de 292nt del segmento M de la muestra original de pulmón del *O. Flavescens* y del sobrenadante de Vero E6 fueron idénticas.

- 484. Acción antiviral de meliacina (MA), un péptido de origen vegetal, sobre la queratitis herpética murina.** A Berra, L Alché, MJ Veloso, C Coto

*Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, FCEyN; Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UBA*

La queratitis herpética (QH) es una infección ocular provocada por el virus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1), cuya reactivación frecuente es causal de ceguera. El modelo murino de queratitis inducida por HSV-1 reproduce la enfermedad, por lo cual es útil para el ensayo de drogas antivirales *in vivo*. MA es un péptido aislado de hojas de *Melia azedarach* L. que inhibe la producción de HSV-1 *in vitro* en ausencia de citotoxicidad. Con el objeto de evaluar la acción de MA sobre la QH, se infectó la córnea de 40 ratones Balb/c de 6-8 semanas con  $10^5$  UFP/5µl de HSV-1 por animal, 20 de los cuales fueron instilados con MA en los días -1, 1, 2, 3 y 14 p.i. En el grupo control no tratado, 18 de 20 ratones presentaron blefaritis, opacificación y necrosis corneal, en tanto que sólo 2 de los 20 ratones infectados y tratados enfermaron. Asimismo, los títulos virales provenientes de ojos de ratones tratados con MA fueron alrededor de 2 órdenes de magnitud más bajos que los obtenidos a partir del grupo control sin tratamiento. Estos resultados indican la potencialidad de MA como antiviral en el tratamiento de la QH murina.

- 485. Estudio de la infección intravaginal de ratas con HSV.** Fabián Benencia, EJ Massouh

*Laboratorio de Inmunoquímica, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires*

En este trabajo se investigó la infección intravaginal de ratas con herpesvirus humanos. La inoculación de hembras de 60 días de edad con distintas dosis de HSV-1 cepa F ( $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^4$  y  $5 \times 10^2$  unidades formadoras de placas) determinó una replicación dosis dependiente del virus, con una mortalidad del 10% para la dosis mayor. Se detectó virus en secreciones durante los 4 días posteriores a la inoculación sin detectarse patología externa en la región vaginal. Un aumento en la mortalidad (25%) fue detectado en animales de 30 días de edad infectados con la misma cepa indicando una susceptibilidad a la infección dependiente de la edad. Las cepas HSV-1 KOS y HSV-2 G infectaron de modo similar a la rata, si bien los títulos virales en secreciones resultaron más altos, con porcentajes de mortalidad del 40 y el 30% respectivamente. Para las distintas cepas fue posible detectar anticuerpos neutralizantes en suero, con títulos máximos hacia los 15 días post-inoculación. La búsqueda de HSV-1 F en distintos órganos reveló la presencia de virus en vagina durante los primeros días de infección, siendo posible encontrar virus en médula espinal el día 6 post-inoculación. El desarrollo de este modelo en rata, donde no existen reportes previos, tiene importancia para el ensayo de vacunas hacia HSV y para el estudio de infección en modelos de desnutrición.

- 486. Cesárea hemostática-transmisión vertical.** M Pesaresi, J Benetucci, S Hermosid, M Bruno, C Terrones

*Servicio de Tocoginecología, Hospital C. G. Durand, FUNDAI, Buenos Aires*

El contagio madre-hijo puede ocurrir durante el embarazo, el parto, y la lactancia. La probabilidad de que el hijo de una embarazada VIH nazca infectado varía entre un 25 y 45% en un país en vías de desarrollo como el nuestro, esta pandemia nos tiene con un 7,2% de Sida pediátrico. Nuestro objetivo es medir la disminución de la transmisión perinatal en embarazadas VIH positivas mediante el uso de la Cesárea Hemostática, la que minimiza el sangrado materno en los momentos previos a la extracción del feto con membranas íntegras, asociado al régimen tripartito con ZDV. Estudio clínico que incluyó 26 binomios madre-hijo tratados según protocolo ACTG 076. Cesárea hemostática programa-

da a las 38 semanas sin trabajo de parto y bolsa íntegra. Seguimiento del recién nacido con PCR y P24 hasta los 18 meses. De los 26 hijos todos resultaron negativos, 12 de ellos con seguimiento mayor de 18 meses y 14 con control mayor a 8 meses hasta la fecha. En 1994 el protocolo ACTG076 logró reducir el contagio madre-hijo al 8%, pensamos que haber conseguido un 0% de TV es un resultado satisfactorio y está en línea con los trabajos de Mandelbrot, Kind y Gomez.

- 487. Efecto antiviral de hormonas vegetales sintéticas sobre virus de importancia clínica.** MB Wachsman<sup>1</sup>, EMF López<sup>1</sup>, J Rodríguez<sup>2</sup>, L Galagovsky<sup>2</sup>, CE Coto<sup>1</sup>

*Laboratorio de Virología<sup>1</sup>, Departamento de Química Biológica y Departamento de Química Orgánica<sup>2</sup>, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.*

Los brassinoesteroides son hormonas vegetales de crecimiento, que presentan en común un esqueleto 5- $\alpha$ -colestano. Mediante síntesis química se obtuvieron doce compuestos derivados de un brassinoesteroide natural. Estos compuestos se ensayaron en células Vero infectadas con virus herpes simplex tipo I (cepas tk<sup>+</sup> y tk<sup>-</sup>), Junín, polio tipo I y estomatitis vesicular (VSV) determinando su potencial citotóxico, que osciló entre 40-400 µM, así como su capacidad de actuar como antivirales. Se encontró que la inhibición de la multiplicación para todos los virus ensayados estuvo entre 90-99,9%, para seis de los doce compuestos, cuando los mismos fueron incorporados mediante 1 hora de adsorción del virus a 37°C y mantenidos hasta el momento de la cosecha (24 ó 48 hs dependiendo del virus). El grado de susceptibilidad de los virus en estudio, varió de acuerdo a los distintos sustituyentes del compuesto, y no a la composición genómica de los mismos.

- 488. Presentación clínica de las infecciones por hantavirus en el área central de argentina.** A Briggiler, S Levis, N Pini, L Riera, D Enría

*INEVH Dr. J. Maiztegui, ANLIS, Pergamino*

Se ha sugerido que en nuestro país la presentación clínica de las infecciones por Hantavirus no responde exclusivamente a la descripción del síndrome pulmonar clásico asociado a virus Sin nombre. En este trabajo se analizaron las formas clínicas de 23 casos asistidos en INEVH y confirmados por serología (Elisa IgM e IgG). En 12 pacientes se identificó el genotipo por RT-PCR y secuenciación. Se observaron cuatro formas: a) Síndrome febril inespecífico leve en 4 casos b) síndrome febril con compromiso renal (oliguria, creatinina ?2g/dl) en 2 casos c) síndrome pulmonar clásico (fiebre, disnea, infiltrado pulmonar bilateral e insuficiencia respiratoria) en cinco casos y d) síndrome febril con combinación de manifestaciones renales y pulmonares en 12 casos. Dos pacientes (b=1 y d=1) presentaron convulsiones. Se identificaron 2 genotipos virales: Lechiguanas (a= 2 casos, b= 2 casos, c= 2 casos y d= 5 casos) y Hu 39694 (d= 1 caso). Estos resultados indican que el mismo genotipo viral muestra en la región central de Argentina cuatro formas de presentación clínica.

- 489. Infecciones por el virus de la encefalitis de san luis (sle) en la zona endémica de fiebre hemorrágica argentina.** M Carrica, G Avilés, P Baroni, AM Briggiler, MS Sabatini, D Enría

*INEVH Dr JI Maiztegui, ANLIS, Pergamino*

El virus SLE (Familia Flaviviridae, género Flavivirus) comparte determinantes antigénicos con otros miembros de la Familia como el Dengue, Fiebre Amarilla, Rocío, Ilheus y Bussuquara. En nuestro país el virus SLE está ampliamente distribuido pero se desconoce su importancia real en salud pública por falta de estudios diagnósticos. En este trabajo se investigaron infecciones por virus SLE en la zona Central de Argentina. Se utilizaron sueros de 334 pacientes notificados para Fiebre Hemorrágica Argentina,

correspondientes a cuatro epidemias comprendidas entre los años 1993-1996. La procedencia de los pacientes fue: 243 de Santa Fe, 88 de Buenos Aires y 3 de Córdoba. Se realizaron pruebas de Neutralización (NT) en cultivos celulares con una cepa autóctona de virus SLE (9275) y ELISA para anticuerpos IgM con un antígeno producido en el INEVH con la misma cepa de virus. Se encontraron 50 sueros positivos de 334 procesados por NT (15%) con títulos de anticuerpos que variaron entre 1:40 y 1:160. No se detectó ninguna conversión serológica. Estos 50 sueros correspondieron a 33 pacientes de Santa Fe y 17 de Buenos Aires. Las infecciones recientes (1 año o menos) determinadas por la prueba de ELISA IgM, fueron 3/50 (6%) y correspondieron a pacientes de 43 a 55 años. Estos resultados concuerdan con observaciones en otras áreas (Chaco, Salta, Río Negro; Avilés, datos no publicados) que muestran una alta endemicidad del virus SLE en distintas zonas del país, lo que puede interferir en el diagnóstico serológico de otras patologías como el Dengue por los cruces serológicos entre ambos virus.

**490. Comparación de neutralización y ELISA en el estudio de la respuesta inmune de vacunados contra la Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA).** Ana Ambrosio, Carmen Saavedra, María Sottosanti, Laura Riera

*INEVH Dr. JI Maiztegui, ANLIS, Pergamino*

El seguimiento de la respuesta en anticuerpos neutralizantes (AcNT) específicos de los vacunados con Candid 1 demuestra 16,2% de sero-negativos que revierten a la positividad. Esto es atribuible a la baja sensibilidad del método serológico, ya que entre ellos predominan significativamente los títulos de AcNT  $\geq$  1:40. Para intentar una mejor estimación del número de individuos sin Ac específicos post-vacunales se titularon por ELISA y NT 585 muestras de suero: 161 sueros de pacientes y 424 de voluntarios vacunados con Candid 1. Se utilizó la NT por inhibición del 80% de UFP y un ELISA directo para IgG. Se encontró que el porcentaje de coincidencia de los resultados positivos entre ambos test en los convalecientes de FHA (94,4%) fue significativamente mayor ( $p < 0.0001$ ) que en los vacunados (25,0%). Se concluyó que: a) el ELISA ensayado no debe aplicarse a la evaluación de la respuesta a la vacuna Candid 1. b) La respuesta inmune a la vacuna Candid 1 tendría componentes que la distinguen de la generada por las cepas silvestres de virus Junín.

**491. Efecto tripanocida del Propranolol.** M Suligoy, R Fernández, R Fretes, J Enders, JM Bustamante, W Rivarola, P Paglini

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

Previamente hemos descripto que la administración de propranolol a ratones infectados con *T. cruzi* provoca disminución en la parasitemia. A los fines de determinar si dicho efecto es por acción directa sobre el parásito se utilizaron tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Tulahuen obtenidos de ratones infectados. La sangre parasitada fue incubada con propranolol durante 24 hs en concentraciones de 10, 20, 30 y 60 mM. La motilidad (determinada por recuento en microscopio óptico) y la vitalidad (tinción con eosina al 0,1%) de los parásitos se estableció a partir de los 5 minutos en distintos tiempos hasta las 24 hs. A partir de las 24 hs el efecto letal de la droga fue total salvo con la concentración de 10 mM. Con la concentración de 30 mM, el efecto letal se observó a los 20 minutos, y con 60 mM, este efecto se detectó a los 5 minutos. El análisis ultraestructural de los parásitos incubados con 30 y 60 mM no mostró ninguna alteración a nivel de microtúbulos subpelviculares ni flagelares, y sí se observaron alteraciones en la estructura del quinetoplasto, lo cual sugiere que el efecto letal de este  $\beta$ -bloqueante podría darse por la interacción con estructuras farmacológicamente similares a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos descriptas en diferentes cepas de *T. cruzi*, y a través de ésta por posibles modificaciones en los mecanismos de transducción de señales. Subsidiado por SeCyT-UNCba y CONICOR.

**492. Actividad vibriocida y su relación con LPS y OMP en una cepa vacunal recombinante de *Vibrio cholerae*.** ME Fernández Miyakawa, NA Mateo, SM Deluchi, ML Brero

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

El título de anticuerpos vibriocidas es utilizado como un marcador de resistencia al cólera. El LPS es el antígeno mayoritario, pero entre la respuesta vibriocida (V) y anti-LPS existe discrepancia. Para establecer su origen se estudió la respuesta individual de ratones ( $n=10$ ) inoculados por vía IP con una cepa vacunal ctxA a las semanas 0, 5 y 13 y sangrados en las semanas 2, 4, 6, 9, 12, 14, 17, 20 y 39. Se midieron los niveles de IgG e IgM antiLPS y antiOMP por ELISA, y la actividad V en sueros individuales. Se correlacionaron los títulos ELISA y V para cada sangría siendo IgM antiLPS el que correlacionó más frecuentemente ( $r > 0,9$ ;  $p < 0,05$ ) y la correlación con el total de sangrías (exceptuadas  $r < 0,5$ ) fue 0,87 ( $p = 0,0001$ ). Se vieron diferencias significativas de títulos V e IgGOMP a la semana 39 con respecto a la 17. En pools de cada sangría se estudió la actividad V luego de la absorción con LPS quedando el 6,25% en la semana 14, 100% en la 2 y en el resto 25%. Al tratar los pools con 2-ME la actividad remanente fue: 1% la 2; 100% la 4, 9 y 17; entre 50-10% el resto. Alicuotas de éstos fueron absorbidas con LPS obteniéndose una inhibición del 90-100% en todas las sangrías exceptuando las semanas 6 (22%) y 12 (50%), correlacionando esta actividad con IgG OMP ( $r = 0,94$   $p < 0,001$ ). En el presente trabajo se observó una predominancia anti LPS (IgM e IgG) en la actividad V, pero no fue exclusiva ni homogénea. Pasados 5 meses de la 3ra inmunización se vio que, con el tratamiento 2-ME y LPS, existía aún actividad IgM antiLPS  $>$  IgG antiLPS e IgM OMP.

## REPRODUCCION II

**493. Resultados preliminares de la administración de antiinflamatorios no esteroideos (AINE) en los índices de fertilización de ratones hembras.** Martini AC, Fiol de Cuneo M, Santillán ME y Busso JM.

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

Mediante inhibición de la ciclooxigenasa, los AINE disminuyen la síntesis de prostaglandinas (PGs). En el presente trabajo estudiamos los efectos de la administración a ratones hembras sexualmente maduras de ibuprofeno (IBU) o piroxicam (PIR) en dosis equivalentes a las empleadas en humanos, sobre los índices de ovulación (IO), de fertilización in vitro (FIV), de fertilización in vivo (FIVo) y número de crías (NC). Se inyectaron i.p. durante 35 días IBU (0,56mg/100g/día) o PIR (0,028mg/100g/día). Los controles (C) fueron inyectados sólo con vehículo. Se indujo superovulación (5UI de PMS/10UI hCG) y se cuantificó IO y FIV, luego de 24h de inseminación con espermatozoides epididimarios sin tratamiento alguno. Para determinar FIVo, las hembras tratadas fueron alojadas con machos por un período de 4 y 9 días después, se evaluó preñez y número de fetos. No se encontraron diferencias significativas en IO, FIVo o NC. Sin embargo, FIV disminuyó significativamente con IBU (73,5%,  $n=132$  vs 86,0% en C,  $n=93$ ;  $p < 0,05$ ) o PIR (68,5%,  $n=181$  vs 83,5% en C,  $n=158$ ;  $p < 0,05$ ). Estudios previos son consistentes con estos hallazgos, posibles de ser atribuidos a déficit de PGs en las células granulosa, situación que dificultaría la penetración del espermatozoide, al menos en condiciones in vitro. Subsidiado por CONICET, CONICOR y SECYT-UNC e incluido en el PRIDRAH-CONICET.

**494. Infiltración de eosinófilos al cérvix uterino inducida por estrógenos: Respuesta genómica?** J Varayoud, JG Ramos, L Kass, M Muñoz de Toro, EH Luque

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

La dilatación del cérvix de la rata durante el parto está bajo control endocrino, e involucra remodelación del colágeno e infiltración de eosinófilos (eos). Previamente demostramos que el 17- $\beta$  estradiol ( $E_2$ ) estimula dicha infiltración y la progesterona (P) ejerce un efecto inhibitorio bloqueado por el RU-486. Nuestro objetivo fue investigar el mecanismo a través del cual el  $E_2$  promueve y modula esta infiltración de eos. Ratas pseudo-preñadas ovariectomizadas el día 9 (D9), fueron tratadas con: a)  $E_2$  (D9-D20: 0.05 $\mu$ g; D21: 0.5 $\mu$ g; D22-23: 1  $\mu$ g); b)  $E_2$ +Tamoxifeno (Tx) (1mg/0.2ml, D21 al D23); c)  $E_2$ + Actinomicina-D (200 $\mu$ g ACT-D/0.1ml, D21); d) Tx+Veh  $E_2$ ; e) ACT-D Veh  $E_2$ ; f) Vehículos. La infiltración de eos, expresada como densidad de volumen (Vv), se cuantificó en cortes de cérvix y cuernos uterinos los D21-22-23. Los animales con  $E_2$ +Tx (D23Vv: 1.20 $\pm$ 0.39) muestran una significativa disminución en el número de eos al compararlos con los tratados con  $E_2$  (D23Vv: 4.30 $\pm$ 0.47,  $p$ <0.05). Los tratados sólo con Tx evidencian un efecto agonista ya que la infiltración fue mayor a los controles (D23Vv: 1.10 $\pm$ 0.26 vs D23Vv: 0.20 $\pm$ 0.09,  $p$ <0.05). Por otro lado, la infiltración de eos inducida por los  $E_2$  observada los D21 y 22 (VvD21: 0.83 $\pm$ 0.14; VvD22: 2.46 $\pm$ 0.19) fue estadísticamente diferente a los tratados con  $E_2$ +ACT-D (VvD21: 0.27 $\pm$ 0.05, VvD22: 0.23 $\pm$ 0.22;  $p$ <0.05). La infiltración de eos en cuernos uterinos es semejante al cérvix. Concluimos que la infiltración de eos inducida por  $E_2$  es una respuesta de tipo genómica; requiere de la unión hormona-receptor y se afecta al inhibir la síntesis proteica.

**495. Organización del citoesqueleto y activación abortiva en oocitos humanos durante las fallas de fecundación.** Vanesa Rawe, Santiago Brugo Olmedo, Florencia Nodar, Gustavo Doncel, Alfredo Vitullo, Anibal Acosta.

Centro de Estudios en Ginecología y Reproducción (CEGYR), Buenos Aires

Si bien los factores cromosómicos que pueden inducir fallas de fecundación están bien caracterizados, no ocurre lo mismo con la participación del citoesqueleto y la activación oocitaria. En este trabajo se analizó la organización del citoesqueleto, cromatina y áster y presencia de activaciones abortivas en oocitos 'no fecundados' luego de Fertilización in Vitro (FIV) e Inyección Intracitoplásmica de Espermatozoides (ICSI). 248 oocitos (108 de FIV y 140 de ICSI) 'no fecundados' (sin formación de pronúcleo) fueron analizados 20-40 hs post FIV o ICSI con anticuerpos monoclonales anti  $\alpha$  y  $\beta$  tubulinas y  $\alpha$  tubulinas acetiladas. El material genético se estudió por tinción con Hoechst 33258 y el análisis citogenético por Tarkowski en 69 oocitos activados luego de ICSI dado que la activación está comprometida por esta metodología. La principal causa de falla de fecundación fue la **ausencia de penetración espermática** (54.9%) luego de FIV y la **falla de activación** (36.5%) luego de ICSI. El grado de alteraciones asociadas al proceso de activación fue superior en ICSI donde se detectaron incluso activaciones abortivas: metafase III, núcleos reticulares y núcleos telofásicos. Alrededor del 22% de los oocitos provenientes de FIV e ICSI tuvieron defectos en los procesos de migración de pronúcleos en los que están involucradas las tubulinas del citoesqueleto.

**496. Modificaciones histo-funcionales de la glándula mamaria durante la segunda mitad de la preñez en la rata. Estudio morfométrico e inmunohistoquímico.** L Kass, J Varayoud, L Bussmann\*, EH Luque, M Muñoz de Toro.

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímicas y Ciencias Biológicas, UNL, Santa Fe; \*IBYME, Buenos Aires

Durante la preñez, la glándula mamaria sufre modificaciones histo-funcionales para adaptarse a la lactancia. Nuestro objetivo fue evaluar: a) marcadores de proliferación celular (BrdU y PCNA) en epitelio y estroma y b) un marcador de diferenciación ( $\alpha$ -lactoalbúmina) en glándulas mamarías de ratas primigrávidas durante la segunda mitad de la preñez. BrdU incorporada, PCNA y  $\alpha$ -lactoalbúmina se evaluaron por inmunohistoquímica desde el día

9 (D9) hasta el parto (D23); se cuantificaron con un método morfométrico expresándose los resultados como densidad de volumen (Vv). La proliferación de las células epiteliales en el D9, evaluada por BrdU, es de Vv: 0.23 $\pm$ 0.05 y disminuye gradualmente hasta el D21 (Vv: 0.053 $\pm$ 0.005). Desde el D21 se observa un ligero pero significativo aumento (D23, Vv: 0.09 $\pm$ 0.01,  $p$ <0.05). La expresión de PCNA en células epiteliales sigue el mismo patrón que la BrdU (rs: 0.68). No se observó proliferación en las células del estroma. La expresión de lactoalbúmina se mantiene constante y a niveles bajos hasta el D21 (Vv: 0.15 $\pm$ 0.02) donde comienza a aumentar, llegando a su máxima expresión en el D23 (Vv: 0.62 $\pm$ 0.01). Durante la 2ª mitad de la preñez, el parénquima mamario exhibe una marcada actividad proliferativa asociada a una creciente diferenciación. La participación de las células estromales en la modulación de las modificaciones histo-funcionales ocurriría sin modificar su patrón de proliferación.

**497. NO y PGE en el ovario de rata diabética tipo I.** Alicia Jawerbaum, E Gonzalez, C Pustovrh, C Perotti, V Novaro, MAF Gimeno.

CEFYBO, Buenos Aires

Trabajos previos demostraron que el óxido nítrico (NO) ovárico estimula la síntesis de PGE en los complejos ovocito cumulus (OVA) de rata, mecanismo que podría estar afectado en la patología diabética. Para evaluarlo se determina la actividad NOS (por conversión de  $^{14}$ C-arginina a  $^{14}$ C-citrulina) y la producción de GMPc (por RIA) en el ovario y la síntesis de PGE (por RIA) en los OVA de ratas controles (C) y diabéticas tipo I (D), obtenidas por administración de estreptozotocina (60 mg/kg) en proestro. La actividad NOS está aumentada en el ovario D: 530 $\pm$ 29 (8) vs C: 326 $\pm$ 11 (8) pmol NO/min.mg  $p$ <0.001. El contenido de GMPc está disminuido en ovario D: 66 $\pm$ 4 (8) vs C: 85 $\pm$ 6 (8)  $p$ <0.05 pmol/g. La síntesis de PGE está disminuida en los ovocitos D:74 $\pm$ 4 (8) vs C:90 $\pm$ 3 (9) pg/OVA  $p$ <0.05, disminuye aún más si se maduran *in vitro*: D:46 $\pm$ 6(8) vs C:92 $\pm$ 3 (7) pg/OVA  $p$ <0.001 y se evidencia también en los OVA ovulados D:133 $\pm$ 20 (8) vs C: 207 $\pm$ 12 (8) pg/OVA  $p$ <0.01. Estos hallazgos muestran en el ovario de-rata D tipo I un déficit en la generación de GMPc y PGE a pesar de la mayor producción de NO, quizás inactivado por elevadas concentraciones de radicales libres de oxígeno.

**498. Participación de  $\beta$ -endorfina en el proceso de ovulación de la rata. Relación con Prostaglandinas y Óxido Nítrico.**

Alicia Faletti, C Perotti, V Rettori, A Lomniczi, MAF Gimeno  
CEFYBO, Buenos Aires

La  $\beta$ -endorfina ( $\beta E$ ), péptido opioide, inhibe el proceso de ovulación de la rata a nivel central y ovárico. El objetivo de este trabajo fue estudiar el contenido de este péptido en ovario y si su acción estaba relacionada con la participación del óxido nítrico (NO) en la ovulación. Para ello se aisló y cuantificó  $\beta E$  por RIA en ratas prepúberes tratadas con PMSG/hCG para inducir la ovulación. A partir de la inyección de hCG los niveles ováricos de  $\beta E$  disminuyeron de 23 $\pm$ 2 (0 hs) a 13 $\pm$ 1 pg/mg (10 hs) ( $p$ <0.01), y aumentaron después de producirse la ovulación (24 $\pm$ 2 pg/mg). Al estudiar la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) por la técnica de conversión de  $^{14}$ C-arginina en  $^{14}$ C-citrulina, observamos que la  $\beta E$  exógena es capaz de inhibir el aumento de la actividad enzimática que se produce durante la ovulación: Ctrl (0hs) = 0.31 $\pm$ 0.02, Ctrl (10hs) = 0.67 $\pm$ 0.03,  $\beta E$  (10hs) = 0.40 $\pm$ 0.02, pmol/min.mg ( $p$ <0.01). Como la  $\beta E$  además inhibe el aumento de la síntesis de prostaglandinas (PGs) preovulatorias, podemos postular que durante el proceso de ovulación de la rata se produce una disminución de  $\beta E$  para permitir el aumento de la producción ovárica de NO y PGs necesarias para la ruptura folicular.

**499. Estudio de las propiedades apoptóticas de las células endometriales eutópicas en pacientes con endometriosis (EDT).** Gabriela F Meresman, RI Barañao, R A Buquet, J Ortiz, O Contreras Ortiz, LS Rumi.

IBYME-CONICET; Hospital de Clínicas, José de San Martín, UBA

**Objetivo:** investigar una posible predisposición de las células del endometrio de pacientes con EDT a ser resistentes a la apoptosis. **Metodos:** Se evaluó apoptosis en cortes de tejido de endometrio eutópico proveniente de 7 de pacientes con EDT: 4 en fase proliferativa (FP) y 3 en fase secretoria tardía (FST) y de 9 controles (C): 6 en FP y 3 en FST. Se utilizó el kit Apoptag basado en la localización y tinción de los extremos 3'-OH de los fragmentos de ADN. **Resultados:** Los datos se expresan como n° de células apoptóticas (CA)/campo. Se detectaron cuerpos apoptóticos sólo en el epitelio glandular. Se observó menor cantidad de CA en tejido endometrial proveniente de pacientes con EDT:  $1.37 \pm 0.28$  vs  $5.41 \pm 1.37$  en los C ( $p < 0.01$ ), esto se dio tanto en la FST:  $0.90 \pm 0.07$  en EDT vs  $9.4 \pm 2.8$  en los C ( $p < 0.05$ ), como en la FP:  $1.6 \pm 0.48$  en EDT vs  $3.8 \pm 0.49$  en los C ( $p < 0.02$ ). No se observaron diferencias significativas de apoptosis en endometrio de EDT de acuerdo al grado de la enfermedad ( $1.2 \pm 0.32$  en EDT I y  $1.6 \pm 0.48$  en EDT IV) ni de acuerdo a la fase del ciclo ( $0.90 \pm 0.07$  en FST vs  $1.6 \pm 0.48$  en FP). **Conclusiones:** las células endometriales de pacientes con EDT poseen características apoptóticas alteradas que las harían más susceptibles a crecer en un sitio ectópico. Estas no se ven modificadas a lo largo del ciclo menstrual ni varían de acuerdo al grado de la enfermedad.

**500. Las hormonas sexuales regulan las Sintetas de Oxido Nítrico en útero de rata.** D Ogando, M Farina, ML Ribeiro, S Perez-Martinez, M Gimeno, A Franchi

CEFYBO, Buenos Aires

Existen dos tipos de Sintetas de Oxido Nítrico: las  $Ca^{2+}$  dependientes (eNOS y nNOS) y la  $Ca^{2+}$  independiente (iNOS). Se sospecha que las hormonas sexuales regulan la síntesis de NO. **Objetivo:** Estudiar la regulación de las isoformas de la NOS en útero de rata adulta por  $17\beta$ -estradiol ( $17\beta E$ ) y progesterona ( $P_4$ ). **Métodos:** Se determinó la actividad de la NOS midiendo la conversión de arginina- $C^{14}$  en citrulina- $C^{14}$ . Se analizó la expresión de la iNOS por Western Blot utilizando anticuerpo específico. **Resultados:** La administración *in vivo* de  $17\beta E$  ( $10 \mu g/rata$ ) aumentó ( $p < 0.05$ ) la actividad NOS uterina a las 12 hs post-inyec. (control:  $7930 \pm 536$  cpm/100mg peso húmedo vs  $17\beta E$ :  $12521 \pm 298$ ). Este aumento fue suprimido por dexametasona (DEXA:  $6 mg/Kg$ , inhibidor de la inducción de iNOS) y por aminoguanidina (AG:  $500 \mu M$ , inhibidor selectivo de la iNOS). Mediante Western blot se observó que  $17\beta E$  y no  $P_4$  aumenta la expresión de la iNOS. La administración *in vivo* de  $P_4$  ( $4 mg/rata$ ) aumentó ( $p < 0.01$ ) la actividad NOS uterina a las 12 hs post-inyec. (control:  $6120 \pm 240$  vs  $P_4$ :  $12215 \pm 56$ ). Este aumento no fue anulado por DEXA, ni por AG. **Conclusión:** Se sugiere que el  $17\beta E$  aumenta la expresión de iNOS en útero de rata, mientras que  $P_4$  aumentaría la producción de NO a través de NOS  $Ca^{2+}$  dependientes.

**501. Interrelación entre prostaglandina  $F2\alpha$  y óxido nítrico en el desarrollo lúteo en la rata.** Alicia B. Motta, G Estevez, MAF Gimeno

CEFYBO, Buenos Aires

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la relación entre la prostaglandina (PG) luteolítica  $F2\alpha$  ( $PGF2\alpha$ ) y el sistema NO en el stress oxidativo durante la luteólisis en la rata. Se trabajó con ovarios provenientes de ratas pseudopreñadas con 15 UI de PMSG. En estadíos medios del desarrollo, la peroxidación lipídica, expresada como nmoles de malondialdehído (MDA) formado por gr-1 de tejido, fue de  $150 \pm 12$ , mientras que en estadíos finales fue de  $343 \pm 23$  ( $p < 0.001$ ). A su vez, la concentración de  $PGF2\alpha$  ovárica, medida por radioinmuno-ensayo fue de  $92 \pm 12$  y  $362 \pm 40$  pg/mg tejido, respectivamente ( $p < 0.001$ ). La incubación durante la fase final, con un inhibidor competitivo de la óxido nítrico sintasa, el  $N^w$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME);  $600 \mu M$ , disminuyó el MDA:  $341 \pm 15$  vs  $55 \pm 8$  nmol/gr;  $p < 0.001$  y la concentración de  $PGF2\alpha$  ovárica:  $353 \pm 45$  vs  $235 \pm 21$ ,  $p < 0.05$ . La inyección i.p. de animales 2 h antes del sacrificio con  $PGF2\alpha$ ;  $0.6 \mu g$  por rata, produjo un aumento de MDA ( $55 \pm 8$  vs  $319 \pm 28$  nmol/gr,  $p < 0.001$ ). Sin embargo este efecto se redujo en un 65% cuando se agregó L-NAME. Estos resultados sugieren que durante la regresión luteal en la rata existe una interrelación entre los efectos de la  $PGF2\alpha$  y el NO.

**502. Variaciones de la población tirotrópica adenohipofisaria en un modelo de malnutrición en monos (*saimiri sciureus*).** GM Cónsole<sup>1</sup>, SB Jurado<sup>2</sup>, FL Riccillo<sup>1</sup>, CG Ferese<sup>1</sup>, HM Pucciarelli<sup>3</sup>, CLA Gómez Dumm<sup>1</sup>

Histología B. Facultad de Ciencias Médicas, UNLP. CIC, BA<sup>1</sup>. S.C. Microscopía Electrónica<sup>2</sup>, CIGEBA<sup>3</sup>. Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP, La Plata

La malnutrición por dieta hipoproteica altera los patrones de secreción hormonal. Se investigaron los cambios inmuno-histoquímicos histométricos y ultraestructurales de la población tirotrópica adenohipofisaria. Se utilizaron 12 monos platirinos (6 machos y 6 hembras) *Saimiri sciureus*, bajo dieta ad libitum con 20% de proteínas en controles y 10% en malnutridos, durante 3 años. Las hipófisis fueron procesadas para microscopía de luz y electrónica. Se inmunomarcó mediante un sistema EnVision (Dako), anti-TSH/DAB. Se determinó por medio de un analizador de imágenes (Optimas) la densidad de volumen (DV) y la densidad de células (DC), hallándose significativamente disminuídas ( $p < 0.05$ ) en malnutridos (M) respecto a controles (C). DV ( $\times 10^{-3}$ ): C $\bar{E}$ :  $9.3 \pm 0.9$ , C $\bar{E}$ :  $12.2 \pm 4$ ; M $\bar{E}$ :  $3.5 \pm 1.4$ , M $\bar{E}$ :  $5.2 \pm 1.8$ . A nivel ultraestructural, en malnutridos se halló descenso del número de gránulos secretorios, complejo de Golgi expandido con gránulos inmaduros y RER laminar. La malnutrición experimental por dieta hipoproteica, induciría cambios inmunohistoquímicos histométricos y ultraestructurales, indicadores de un posible descenso en la secreción de TSH en la población tirotrópica adenohipofisaria.