

Revista de

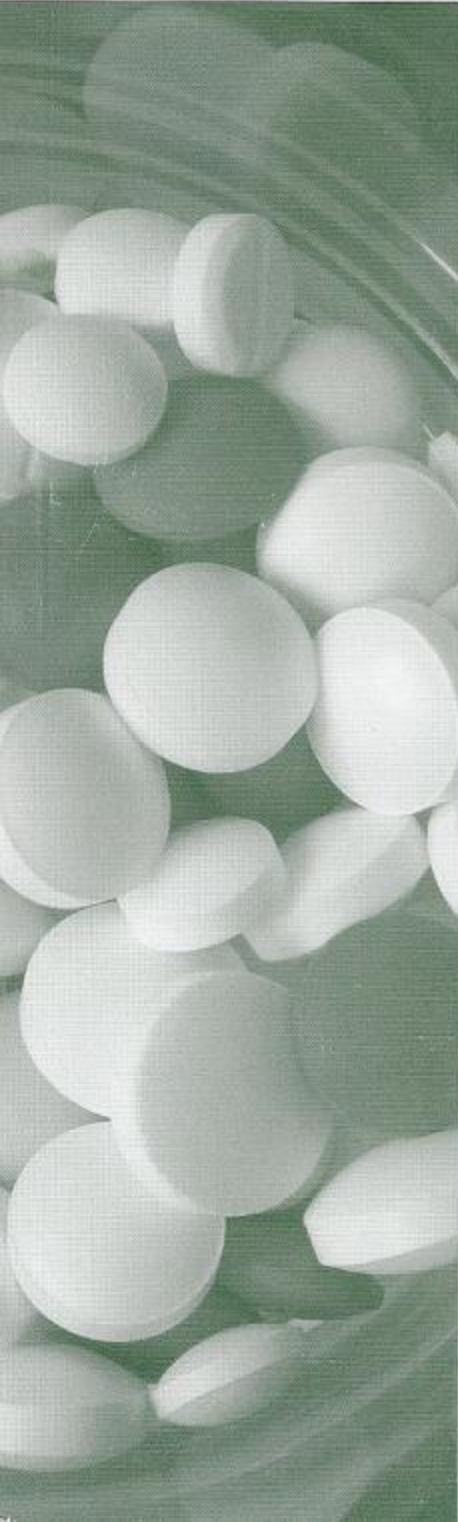
Farmacología de Chile

Órgano oficial de la Sociedad de Farmacología de Chile • <http://www.sofarchi.cl>

Volumen 6, Número 3

ISSN N° 0718-8811

2013



XXXV Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile

• ARTÍCULOS DE REVISIÓN:

NEW INSIGHTS INTO PHARMACOLOGICAL LIVER PRECONDITIONING STRATEGIES:
L-3,3,5-TRIIODOTHYRONINE AND N-3 LONG CHAIN POLYUNSATURATED FATTY ACIDS.
Luis A. Videla, Virginia Fernández, Gladys Tapia.

EL TRANSPORTADOR DE SEROTONINA: VARIANTES GENÉTICAS Y TRASTORNOS
NEUROPSIQUIÁTRICOS.
Pablo R. Moya.

• CONGRESO SOFARCHI 2013:

CONFERENCIAS

SIMPOSIOS

COMUNICACIONES ORALES

COMUNICACIONES ORALES POSTULANTES AL PREMIO PROFESOR
DR. JORGE MARDONES RESTAT

COMUNICACIONES ORALES POSTULANTES A INCORPORACIONES

COMUNICACIONES EN PANELES

Panel de Editores:

La Revista de Farmacología de Chile tiene un panel de editores conformado por connotados farmacólogos nacionales que son miembros de la Sociedad de Farmacología de Chile y académicos de las principales universidades chilenas.

Comité Editorial:

Dr. Ramón Sotomayor-Zárate, **Editor en Jefe**
Dr. Pablo Jara Picas, **Co-Editor**
Dr. Hernán E. Lara
Dra. Viviana Noriega
Dr. Juan Carlos Prieto
Dra. Jacqueline Sepúlveda
Dr. Juan Pablo G. Huidobro-Toro

Dra. Katia Gysling
Dra. Inés Ruiz
Dr. Iván Saavedra S.
Dr. Alfonso Paredes V.
Dr. Rodrigo Castillo P.
Dra. Gabriela Díaz-Véliz
Dr. Patricio Iturriaga-Vásquez

Evaluadores Asociados:

Dr. Hugo F. Miranda
Dra. María Eugenia Letelier
Dr. Frederick Ahumada
Dr. Gonzalo Bustos O.
Dr. Raúl Corrales V.
Dr. Guillermo Díaz-Araya
Dra. Verónica Donoso
Dr. Mario Faúndez
Dra. Jenny Fiedler
Dr. Miguel Reyes-Parada
Dr. Yedy Israel
Dr. Ricardo Maccioni
Dra. Verónica Kramer
Dr. Sergio Lavandero
Dr. Juan Diego Maya
Dr. Antonio Morello

Dr. Jorge Farías Avendaño
Dra. Myriam Orellana
Dra. María Elena Quintanilla
Dra. Teresa Pelissier S.
Dr. Javier Puente
Dr. Luis Quiñones
Dr. Patricio Saéz-Briones
Dra. Coralía Rivas
Dr. Leonel Rojo
Dra. Lutske Tampier
Dra. Gladys Tapia
Dra. M. Antonieta Valenzuela
Dra. M. Araceli Valle
Dr. Luis Videla
Dr. Raúl Vinet
Dr. Bruce K. Cassels
Dr. Sergio Mora

Revista de Farmacología de Chile

Derechos Reservados Sociedad de Farmacología de Chile

ISSN 0718-8811 versión impresa

ISSN 0718-882X versión digital

Todos los derechos reservados. Ninguna parte de esta publicación puede ser reproducida, almacenada en sistema alguno de tarjetas perforadas o transmitida por otro medio -electrónico, mecánico, fotocopiador, registrador, etcétera- sin permiso previo por escrito del comité editorial.

EDITORIAL

Ramón Sotomayor-Zárate, Pharm.D., Ph.D

Editor en Jefe

Vice-Presidente de la Sociedad de Farmacología de Chile

El tercer volumen de este año de la Revista de Farmacología de Chile está centrado principalmente en los resúmenes científicos de nuestro XXXV Congreso Anual, en donde encontraremos el quehacer nacional en investigación farmacológica de académicos de las principales universidades chilenas. Además, se han publicado 2 excelentes artículos originales de revisión sobre las nuevas estrategias terapéuticas en preconditionamiento hepático y sobre las variantes genéticas del transportador de serotonina.

Durante este año, hemos realizado un gran esfuerzo que se ha materializado en dos números temáticos centrados en el estrés oxidativo y otro en la docencia en farmacología. En estos números se publicaron 12 artículos originales de revisión realizados por destacados investigadores nacionales e internacionales. El primer número del año 2014 corresponderá a la unidad temática de Farmacología Endocrina.

Finalizando, solo me cabe invitar nuevamente a todos nuestros socios activos e investigadores nacionales de disciplinas afines a la farmacología para que nos hagan llegar revisiones y artículos de originales de su quehacer científico. En este sentido, se hace indispensable una publicación sobre los aspectos relevantes y necesarios para la docencia en farmacocinética y farmacodinamia.

EDITORIAL: XXXV CONGRESO ANUAL DE LA SOCIEDAD DE FARMACOLOGÍA DE CHILE

Rafael A. Burgos, M.Sci., M.V.

Presidente de la Sociedad de Farmacología de Chile

A nombre de la Sociedad de Farmacología de Chile, SOFARCHI, les doy la bienvenida a nuestro XXXV Congreso Anual, que se realiza en la bella ciudad de Valdivia.

Hemos preparado un programa que mostrará los avances más reciente de nuestra disciplina en el país y el extranjero. En esta oportunidad se realizarán tres conferencias que abordarán desde patologías complejas como la Nefropatía diabética y su implicancia en el tratamiento, los efectos de tratamientos no farmacológicos en trastornos metabólicos asociados a síndrome de ovario poliquístico y lo más reciente del Estado del arte en inmunidad innata.

Se desarrollarán 7 simposios en distintas áreas que incluyen, receptores de Cininas, Biofármacos, Alteraciones del control del sistema autónomo en la función ovárica, El rol de TGF beta en la fibrosis, Neurofarmacología del estrés y Propiedad intelectual en innovación farmacéutica. Retomamos nuestra vinculación con el Programa de Doctorado en Farmacología, realizando un simposio que permitirá a nuestros socios conocer el trabajo de estos nuevos investigadores.

Como en años anteriores hemos querido incentivar la incorporación de nuevos socios. Consideramos esta una de las actividades más importante de nuestro congreso, ya que permite a nuevas generaciones de investigadores y académicos enriquecer nuestra sociedad, proyectándola hacia el futuro.

La farmacología es muy diversa, e incorpora distintas sub-áreas y líneas de investigación, que en este congreso se aprecian de manera representativa en los resúmenes que presentamos en esta edición de la revista de la SOFARCHI.

Finalmente aprovecho de agradecer muy sinceramente el patrocinio y auspicio de la Universidad Austral de Chile y de las empresas W. Reichmann y Cía. Ltda., TCL, Fermelo, Valquim, Sigma-Aldrich, Andes Import, Genexpress, Lab-Tec Ltda., Galénica, Ivens S.A., Prolab, UB Úrsula Biggemann y Cía. Ltda., que con su presencia apoyan el desarrollo de una actividad más completa y variada.

Llevar a cabo un Congreso es tarea de equipo, y por este motivo quisiera reconocer el trabajo de la directiva de la SOFARCHI, de mis colegas en Valdivia, juntos han hecho un tremendo esfuerzo por organizar este Congreso.

Espero que vuestra estadía en la ciudad de Valdivia sea provechosa y que podamos disfrutar de unos días de fraternidad y camaradería, en torno a una Sociedad Científica en constante crecimiento.

CONTENIDO

Revista de Farmacología de Chile

AÑO 2013 VOLUMEN 6 NÚMERO 3

ARTÍCULOS DE REVISIÓN:

NEW INSIGHTS INTO PHARMACOLOGICAL LIVER PRECONDITIONING STRATEGIES: L-3,3,5-TRIIODOTHYRONINE AND N-3 LONG-CHAIN POLYUNSATURATED FATTY ACIDS

Luis A. Videla, Virginia Fernández, Gladys Tapia

EL TRANSPORTADOR DE SEROTONINA: VARIANTES GENÉTICAS Y TRASTORNOS NEUROPSIQUIÁTRICOS

Pablo R. Moya

XXXV CONGRESO ANUAL DE LA SOCIEDAD DE FARMACOLOGÍA DE CHILE:

CONFERENCIAS:

NEFROPATÍA DIABÉTICA: ASPECTOS PATOGENICOS E IMPLICANCIAS TERAPÉUTICAS

Sergio Mezzano

HIGH SYMPATHETIC NERVE ACTIVITY IN WOMEN WITH POLYCYSTIC OVARY SYNDROME - CAN IT BE REDUCED BY ACUPUNCTURE AND EXERCISE?

Elisabet Stener-Victorin et al.

LIFE BEYOND MICE - INNATE IMMUNITY WHERE IT REALLY MATTERS

Dirk Werling

SIMPOSIOS:

RECEPTORES DE CININAS Y PATOLOGÍAS

BIOFÁRMACOS: ESTRATEGIAS DE ELECCIÓN, DISEÑO Y PRODUCCIÓN

AUTONOMIC (SYMPATHETIC AND CHOLINERGIC) CONTROL OF THE OVARY FUNCTION AND ITS PATHOPHYSIOLOGICAL IMPLICATIONS

PROGRAMA DOCTORADO EN FARMACOLOGÍA: PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES B-ADRENÉRGICOS EN LA FUNCIÓN CARDÍACA Y REPRODUCTIVA

FIBROSIS ASSOCIATED WITH CHRONIC DISEASES: TGF- β AND ITS CONTRIBUTION TO FUNCTIONAL IMPAIRMENT

NEUROFARMACOLOGÍA DEL ESTRÉS: NUEVOS BLANCOS FARMACOLÓGICOS Y ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS

PROPIEDAD INTELECTUAL, INNOVACIÓN FARMACÉUTICA Y ACCESO A NUEVOS MEDICAMENTOS

COMUNICACIONES CIENTIFICAS:

COMUNICACIONES ORALES

COMUNICACIONES ORALES POSTULANTES AL PREMIO PROF. DR. JORGE MARDONES RESTAT

COMUNICACIONES ORALES POSTULANTES A INCORPORACIONES

COMUNICACIONES EN PANELES

REVIEW ARTICLE

NEW INSIGHTS INTO PHARMACOLOGICAL LIVER PRECONDITIONING STRATEGIES: L-3,3,5-TRIIODOTHYRONINE AND N-3 LONG-CHAIN POLYUNSATURATED FATTY ACIDS

Luis A. Videla, Virginia Fernández, Gladys Tapia

Laboratory of Oxidative Stress and Hepatotoxicity, Molecular and Clinical Pharmacology Program, Institute of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, University of Chile.

ABSTRACT

Liver preconditioning (PC) refers to the development of an increased tolerance to injuring stimuli such as ischemia-reperfusion (IR), which is induced by previous maneuvers triggering beneficial molecular and functional changes. Since liver PC is important in human major hepatic resections and liver transplantation, numerous PC strategies have been evaluated in the IR liver injury model. These include gene therapy, surgical maneuvers, and pharmacological approaches, with few of them being transferred to the clinical setting. In recent years, our group has assessed the PC action of thyroid hormone (T_3) and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (n-3 LCPUFA) that abrogate liver injury due to 1 h ischemia-20 h reperfusion in the rat. The underlying mechanisms involve (i) the T_3 -induced redox activation of the hepatic transcription factors Nrf2, NF- κ B, STAT3, and AP-1 upregulating the expression of protective proteins; and (ii) the n-3 LCPUFA-induced PPAR- α activation and formation of oxidation products with antioxidant and anti-inflammatory responses, PC strategies that have potential clinical application.

Keywords: Ischemia-reperfusion injury, Liver preconditioning, Thyroid hormone (T_3), n-3 Long-chain polyunsaturated fatty acids

Published by the Chilean Society of Pharmacology

INTRODUCTION

Due to the multiplicity of processes involved with liver functioning, namely, most pathways of intermediary metabolism, plasma protein synthesis, biotransformation of xenobiotics, excretion and secretion of several metabolites and mediators, an extremely elevated energy requirement is needed under physiological and pathological conditions. This is primarily met by fatty acid (FA) oxidation, with the exception of hyperglycemic conditions, which imposes on the liver an strict dependency on O_2 supply and high susceptibility to hypoxic conditions (Videla & Fernández, 2009).

In this respect, liver damage is associated with ischemia-reperfusion (IR) episodes, including hepatic resection, liver transplantation, abdominal surgery requiring hepatic vascular occlusion, and low-blood pressure conditions

(Bahde & Spiegel, 2010). From the mechanistic viewpoint, IR liver injury is elicited by shortage of O_2 and nutrient supply during ischemia that is exacerbated upon restoration of blood flow, with Kupffer cell activation, neutrophil infiltration, oxidative stress, and pro-inflammatory cytokine signaling as major contributory factors (de Rougemont et al, 2009; Bahde & Spiegel, 2010; Jaeschke, 2011).

Key mediating events in IR liver injury include (i) ischemia-induced ATP depletion with loss of Ca^{2+} , Na^+ , and H^+ homeostasis and concomitant activation of hydrolytic enzymes, impaired cell volume regulation, and cell swelling; (ii) activation of complement in which factor C5a promotes neutrophil recruitment into sinusoids and primes Kupffer cell for reactive oxygen species (ROS) production;

Corresponding author: Prof. Luis A. Videla, Molecular and Clinical Pharmacology Program, Institute of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, University of Chile, Independencia 1027, Sector-D, Independencia, Santiago, Chile. Tel: 56-2-29786256, Fax: 56-2-27372783, E-mail: lvidela@med.uchile.cl

(iii) formation and release of pro-inflammatory cytokines (tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin 1 (IL-1)) by Kupffer cells; (iv) chemokine generation by neutrophils (cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1)) and Kupffer cells (IL-8); (v) inadequate anti-inflammatory cytokine response (IL-6, IL-10); (vi) lipid mediators such as platelet activating factor (PAF) formed by endothelial cells priming neutrophils for ROS production; (vii) upregulation of intercellular (ICAM-1) and vascular (VCAM-1) adhesion molecules for neutrophil accumulation at the site of inflammation; and (viii) microcirculatory disturbances and non-perfused sinusoids due to insufficient nitric oxide (NO) production and enhanced vasoconstrictors (endothelins) formation (Jaeschke, 2003). Since IR injury to the liver is a major complication in clinical practice, old donors and hepatic steatosis being factors increasing the susceptibility of the liver to IR in organ transplantation, strategies reducing IR liver damage have been addressed extensively (Das & Das, 2008; de Rougemont et al, 2009).

LIVER PRECONDITIONING AND POSTCONDITIONING STRATEGIES

Liver preconditioning (PC) refers to the development of an enhanced tolerance to IR injury due to previous maneuvers inducing beneficial molecular and functional changes, a phenomenon originally described in the heart (Murry et al, 1986). In past years, several therapeutic strategies have been developed to attenuate or prevent IR liver injury such as gene therapy, surgical strategies, and pharmacological approaches. In the former case, overexpression of proteins suppressing either (i) ROS production (superoxide dismutase (SOD), catalase, heme-oxygenase-1 (HO-1), (ii) apoptosis (Bcl-2, Bag-1), (iii) pro-inflammatory nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation (inhibitor of κ B- α), or (iv) IL-1 action (IL-1 receptor antagonist) have been tested (Selzner et al, 2003; Coito et al, 2002; Harada et al, 2002; Fan et al, 1999), in addition to downregulation of ICAM-1 expression limiting neutrophil infiltration (Sonnenday et al, 2004). However, problems related to vector toxicity, low transfection efficiency and protein expression in gene therapy limit its use in the clinical setting (Casillas-Ramírez et al, 2006).

Surgical strategies such as ischemic PC (IPC) consisting of a brief period of ischemia prior to a short reperfusion time before a prolonged ischemic stress has also been described in experimental animals, with the autocooids adenosine, NO, bradykinin, and opioids playing crucial protective roles (Peralta et al, 1997). Binding of the above mediators to G-protein coupled receptor increases phospholipase-C activity and diacylglycerol production, with the consequent activation of protein kinase C (PKC), mitogen-activated protein kinase (MAPK), heat shock factor 1, and NF- κ B (Selzner et al, 2012). This signaling cascade result in promotion of the nuclear transcription of protective

mediators, including inhibitors of apoptosis, SOD, inducible NO synthase, and heat shock proteins (Das & Das, 2008; Selzner et al, 2012). Although IPC is useful in human liver resections and in human liver transplantation, this PC strategy remains controversial (Casillas-Ramírez et al, 2006; Bahde & Spiegel, 2010). In addition to IPC, intermittent clamping consisting of various cycles of short intervals of ischemia (15 min) and reperfusion (5 min) was developed, which represents a preferred technique for prolonged ischemia, pathological liver and elderly patients, whereas IPC seems to be more useful for short ischemia and young patients (Bahde & Spiegel, 2010). Considering that IPC is limited by the timing of the procedure as it has to be initiated before the onset of ischemic injury, the new strategy of ischemic postconditioning (IPostC) was developed, a maneuver consisting of intermittent interruptions of blood flow in the early phase of reperfusion, which has been studied in liver, heart, brain, and kidney (Selzner et al, 2012). Similar to IPC, IPostC involves stimulation of G-protein coupled receptors by mediators such as adenosine, bradykinin, ROS, and others, promoting the activation of kinase signaling pathways and ATP-dependent potassium channels, resulting in inhibition of mitochondrial transition pores with apoptosis prevention (Hausenloy et al, 2005). Although liver IPostC is experimental models is an alternate and effective approach against IR injury, no clinical data is available in human liver surgery.

The concept of pharmacological PC is based on protective mechanisms induced by a large number of pharmacologic agents affording defense against IR injury in the liver. The protective mechanisms of action of these agents involve either (i) direct interference of injurious pathways or (ii) indirect induction of a low level of stress triggering cellular defense mechanisms against a subsequent stronger insult, subjecting the liver to PC (Selzner et al, 2003; Bahde & Spiegel, 2010), as shown in Table 1. However, pharmacological approaches often affect only one or a few factors (Table 1) involved in the complex and multifactorial phenomenon of IR. Consequently, most pharmacological PC protocols have not been applied in the clinical setting, with the exception of methylprednisolone that shows promising results in terms of improved clinical outcome (Aldrighetti et al, 2006; Bahde & Spiegel, 2010). Major drawbacks include (i) lack of positive impact on postoperative clinical course (antioxidants, vasodilators); (ii) side effects (dopamine, adenosine); (iii) difficulties in implementation (ozone, hyperbaric oxygen); (iv) agents that do not reach their site of action at the right concentration or time (glutathione ester, TNF- α antibody); (v) changes in dose leading to opposite effects (NO donors); and (vi) lack of effectiveness in the presence of steatosis (Casillas-Ramírez et al, 2006; Bahde & Spiegel, 2010).

According to these considerations, our group has undertaken the study of alternate experimental liver pharmacological PC strategies that might have clinical application, namely, thyroid hormone (L-3,3,5-

triiodothyronine, T₃) (Fernández et al, 2007a), n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (n-3 LCPUFAs) (Zúñiga et al, 2010), or iron (Galleano et al, 2011).

Table 1. Pharmacological strategies to prevent hepatic ischemia-reperfusion injury

Agent (Reference)	Preconditioning mechanisms
Chloroquine (Kayawake et al, 1982) Chlorpromazine (Churchill et al, 1995)	Recovery of mitochondrial functioning and loss of phospholipids during ischemia
TNF- α antibody (Colletti et al, 1990) Methylprednisolone (Aldrighetti et al, 2006)	Inhibition of pro-inflammatory TNF- α signaling Anti-inflammatory therapy based on NF- κ B and AP-1 downregulation
α -Tocopherol (Soltys et al, 2001) Glutathione ester (Peralta et al, 2002) Ebselen (Ozaki et al, 1997) Trolox (Wu et al, 1991) Allopurinol (Fernández et al, 2002)	Antioxidant action neutralizing ROS production Inhibition of ROS generating enzyme xanthine oxidase
Dopamine (Hasselgren, 1987) ATP-MgCl ₂ (Chaudry, 1989)	Reduction of microcirculatory disturbances
Adenosine (Peralta et al, 1997) NO donors (Serafin et al, 2002) L-Arginine (Koti et al, 2002) ICAM-1 antibody (Farhood et al, 1995) P-Selectin antibody (Peralta et al, 2001) Cyclosporine (Suzuki et al, 1993)	Inhibition of neutrophil infiltration
Cerulein (Chavin et al, 2004) Carnitine (Tolba et al, 2003)	Downregulation of UCP-2 expression in steatotic livers due to increased ATP availability prior to IR
Trimetazidine (Kaya et al, 2003)	Anti-ischemic effects by targeting energy metabolism, oxidative stress, and microcirculatory changes
AICAR (Carrasco-Chaumel et al, 2005)	Enhancement in NO synthesis with reduction of oxidative stress
Angiotensin-converting enzyme (ACE) Inhibitor Captopril Angiotensin II (Ang-II) type 1 receptor Blocker Losartan (Guo et al, 2004)	Inhibition of ICAM-1 expression and TNF- α synthesis, with stimulation of hepatocellular proliferation
Diazoxide (Tian et al, 2013)	Mitochondrial-K _{ATP} channel opener
Pentoxifylline (Rüdiger & Clavien, 2002)	Inhibition of cyclic 3',5'-nucleotide, Phosphodiesterase activity and TNF- α synthesis
RXPO3 (Cursio et al, 2002)	Matrix metalloproteinase inhibitor
Doxorubicin (Ito et al, 2000) Ozone (Ajamieh et al, 2004) Hyperbaric oxygenation (Yu et al, 2005) Thyroid hormone (Fernández et al, 2007) n-3 LCPUFA (Zúñiga et al, 2010) Iron (Galleano et al, 2011)	Development of moderate and transient oxidative stress prior to the IR protocol

Abbreviations: AP-1, activating protein 1; AICAR, 5-Amino-4-imidazole carboxamide riboside; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; n-3 LCPUFAs, n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids; NF- κ B, nuclear factor- κ B; NO, nitric oxide; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; ROS, reactive oxygen species; UCP-2, uncoupling protein-2. For additional information, see reviews by Selzner et al. (2003), Casillas-Ramírez et al. (2006), and Bahde & Spiegel (2010).

T₃ LIVER PRECONDITIONING

T₃-induced calorigenesis, liver O₂ consumption, and ROS production:

The PC effect of T₃ upon the liver is based on the calorigenic action leading to stimulation of basal thermogenesis (Schwartz & Oppenheimer, 1978) that is carried out through genomic and non-genomic mechanism (Videla & Fernández, 2009). The genomic pathway involves the formation of transcriptionally active complexes of T₃ with thyroid hormone receptors (TRs), which upon recognition by specific T₃ response elements in DNA trigger the expression of respiratory, metabolic, and uncoupling protein genes, with consequent enhancement in the rate of O₂ consumption of the liver (Fig.1A) (Videla et al. 2007). In addition, a number of effects of T₃ are independent on TRs, show rapid onset action, and employ alternate signaling mechanisms (Davis et al. 2008). Among these non-genomic pathways, significant activation of cytochrome-c-oxidase is elicited by T₃ and 3,5-diiodothyronine (3,5-T₂) through binding to its Va subunit that abolishes the allosteric inhibition by ATP, thus enhancing mitochondrial respiration (Arnold et al. 1998). Under these conditions, elevation in the rate of superoxide radical (O₂^{•-}) and hydrogen peroxide (H₂O₂) production is achieved by T₃ in liver submitochondrial particles, representing a major ROS generating system in hyperthyroid state (Fernández & Videla, 1993). Liver ROS production induced by T₃ is also elicited at microsomal, cytosolic, and peroxisomal levels in hepatocytes, with Kupffer cells playing a main contributory role due to enhancement in their respiratory burst activity associated with enhanced NADPH oxidase function (Fig. 1A) (Videla et al. 2007). The pro-oxidant state induced in the liver by T₃ can be considered as a mild, non-toxic redox alteration, as suggested by the lack of occurrence of morphological changes in liver parenchyma, except for the hyperplasia and hypertrophy of Kupffer cells (Videla et al. 2007). Under conditions of moderate ROS production, redox signaling can be achieved, a process involving site-specific and reversible modifications in proteins participating in signal transduction pathways, such as receptors, kinases, phosphatases, and transcription factors (Leonarduzzi et al. 2011).

Molecular mechanisms in T₃-induced liver preconditioning:

The administration of a single dose of T₃ (0.1 mg/kg) to fed rats elicited liver PC against 1 h ischemia-20 h reperfusion in association with the development of a transient oxidative stress condition within a time period of 48 h, with concomitant activation of Kupffer cells and lack of hepatotoxicity (Fernández et al. 2007a). Under these conditions, ROS production triggered by T₃ at the Kupffer-cell and hepatocyte levels activates redox-sensitive transcription factors nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), NF-κB, signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), and activating

protein 1 (AP-1), as evidenced by the abolishment of their DNA binding capacity by pre-treatment with antioxidants or the Kupffer-cell inactivator gadolinium chloride (GdCl₃) (Fig. 1A) (Romanque et al. 2011; Videla & Fernández, 2009).

Nrf2 is sensitive to a rather low oxidative stress status (Gloire et al. 2006) as that induced by the calorigenic action of T₃. Increased cellular ROS production promotes the dissociation of Nrf2 from its negative regulator Kelch-like ECH-associating protein 1 (Keap1) in the cytosol, which favors Nrf2 translocation into the nucleus and its interaction with antioxidant response elements to activate target gene transcription (Zhang, 2006). Liver Nrf2 is transiently upregulated by T₃ administration in a redox- (Romanque et al. 2011) and Kupffer-cell-dependent process (Videla et al. 2012a), with concomitant antioxidant protein expression (Videla et al. 2012b). This is evidenced by the induction of hepatic thioredoxin (Thr) (Romanque et al. 2011), heme-oxygenase-1 (HO-1), and glutamate-cysteine ligase (GCL) (Videla et al. 2012b) (Fig. 1A), a response that is essential to limit oxidative stress associated with injurious phenomena such as IR. In fact, Thr exerts antioxidant protection due to its reducing potential, HO-1 is involved in heme catabolism avoiding its pro-oxidant action, with production of the antioxidant products biliverdin and CO, and ferritin induction by iron release, whereas GCL is the limiting enzyme in the biosynthesis of the main hydrosoluble antioxidant glutathione (GSH) (Romanque et al. 2011; Videla et al. 2012b). Induction of Nrf2-controlled phase-II detoxification enzymes by T₃ represents an additional hepatoprotective mechanism due to their roles in xenobiotic biotransformation of potentially toxic epoxides, quinones, and electrophiles (Fig. 1A). These include hepatic (i) microsomal epoxide hydrolase 1 (Eh1) transforming alkene epoxides and arene oxides into dihydrodiol derivatives, (ii) NADPH-quinone oxidoreductase 1 (NQO1) catalyzing the two electron reduction of quinones into hydroquinones, and (iii) glutathione-S-transferases Ya and Yp (GST) conjugating electrophilic metabolites with GSH (Cornejo et al. 2013). Dihydrodiol derivatives produced by Eh1 and hydroquinones formed by NQO1 are subjected to glucuronidation and/or sulfation, which, in addition to glutathione conjugates, constitute readily excretable forms of reactive metabolites. In this respect, T₃ upregulated the expression of phase-III transporters that is also Nrf2-dependent, namely, sinusoidal multidrug resistance-associated protein 3 (MRP-3) retro-transporting xenobiotic conjugates and bile acids, and canalicular MRP-2 excreting anionic drugs and xenobiotic conjugates (Fig. 1A) (Cornejo et al. 2013). These findings, and the induction of antioxidant proteins and phase-I enzymes by T₃ (Fernández & Videla, 1989), suggest the development of a higher hepatic capacity for xenobiotic processing and elimination in hyperthyroid state, triggering the elimination of toxic

metabolites arising from oxidative stress and xenobiotic biotransformation processes thus affording PC. ROS generated at Kupffer cell and hepatocyte levels by T_3 trigger specific signaling mechanisms that reinforce each other to achieve significant transcription of cytoprotective genes. Under these conditions, antioxidant-dependent GdCl₃-sensitive activation of NF- κ B and AP-1 (Fig. 1A) is associated with enhanced expression and release of TNF- α and IL-6 from Kupffer cells into hepatic sinusoids, which upon interaction with the respective receptors TNF- α receptor 1 and IL-6 receptor/gp130 trigger signaling cascades in hepatocytes that may be also stimulated by hepatocytic ROS (Videla & Fernández, 2009). These include (i) NF- κ B activation through inhibitor of κ B- α kinase (IKK α) phosphorylation, with the expression of antioxidant, anti-

apoptotic, and type I acute-phase proteins (Fernández et al. 2005); Tapia et al. 2006); and (ii) AP-1 activation via cJun N-terminal kinase (JNK) phosphorylation that upregulates hepatocyte proliferation (Fig. 1A) (Fernández et al. 2007b). In addition to NF- κ B and AP-1 redox activation, T_3 -induced Kupffer cell-derived IL-6 activates Janus kinase (JAK)/STAT3 cascade through interaction with IL-6R/gp130, triggering the transcription of Type I and type II acute-phase proteins and cell proliferation (Fig. 1A) (Tapia et al. 2006). Furthermore, recent studies revealed that the protective effect of T_3 against IR liver injury is also associated with downregulation of adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 expression, as well as that of endothelin-1 (Taki-Eldin et al. 2012).

Figure 1.

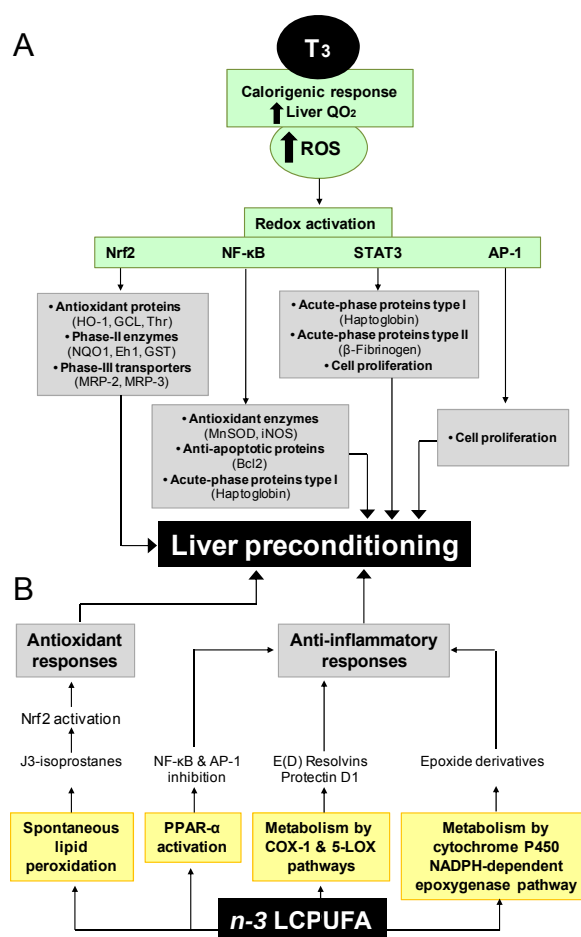


Figure 1. Molecular mechanisms involved in liver preconditioning induced by thyroid hormone (T_3) (A) and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (n-3 LCPUFA) (B). **Abbreviations:** AP-1, activating protein 1; COX-1, cyclo-oxygenase 1; Eh1, microsomal epoxide hydrolase 1; GCL, glutamate cysteine ligase; GST, glutathione-S-transferases; HO-1, heme-oxygenase 1; iNOS, inducible nitric oxide synthase; 5-LOX, 5-lipoxygenase; MnSOD, manganese superoxide dismutase; MRP-2(3), multidrug resistance protein 2(3); NF- κ B, nuclear factor- κ B; NQO1, NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1; Nrf2, nuclear factor-erythroid 2 related factor 2; PPAR- α , peroxisome proliferator-activated receptor α ; QO₂, oxygen consumption rate; ROS, reactive oxygen species; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3; Thr, thioredoxin.

n-3 LCPUFA LIVER PRECONDITIONING

The n-3 LCPUFAs eicosapentaenoic acid (C20:5n-3; EPA) and docosahexaenoic acid (C22:6n-3; DHA) are crucial structural components of cellular lipids and substrates for the biosynthesis of physiological mediators, which are synthesized from α -linolenic acid (C18:3n-3). EPA and DHA are related to several positive health effects, allowing the proposal for their use in the prevention of numerous non-transmissible chronic diseases (Fetterman & Zdanowicz, 2009; Valenzuela & Videla, 2011) and against the injury caused to heart (Rodrigo et al. 2008) and liver (Zúñiga et al. 2010) by IR episodes. In fact, n-3 LCPUFA administration to rats for seven days prior to IR led to enhancement in the liver n-3 LCPUFA content, with diminution in n-6/n-3 LCPUFA ratios and prevention of IR-induced liver injury. This protective response is associated with abrogation of hepatic oxidative stress and recovery of both pro-inflammatory cytokine homeostasis and NF- κ B functionality lost during IR (Zúñiga et al. 2010). Furthermore, significant reduction in both portal pressure during reperfusion and in the time for Trypan Blue to distribute evenly in the liver was observed in n-3 LCPUFA-fed rats over controls, concomitantly with improvement in bile production, suggesting that n-3 LCPUFA minimized IR injury by improving the hepatic microcirculation (Zhong & Thurman, 1995). Similar changes are achieved by n-3 LCPUFA supplementation in animals subjected to a high fat diet, which also exhibited reduction in hepatic liver lipid content and insulin sensitivity improvement (Valenzuela et al. 2012).

n-3 LCPUFA-INDUCED ANTIOXIDANT RESPONSES

Antioxidant responses associated with in vivo n-3 LCPUFA provision are related to their high susceptibility to undergo spontaneous lipid peroxidation with formation of cyclopentenone-containing J-ring isoprostanes (J3-isoprostanes), which promote Nrf2 activation (Fig. 1B) (Gao et al. 2007). This is achieved by reaction of n-3 LCPUFA-derived J3-isoprostanes with Keap1, initiating Keap1 dissociation from Cullin3 and nuclear Nrf2 translocation, thereby inducing Nrf2-directed gene expression (Gao et al. 2007). In agreement with these findings, n-3 LCPUFA oxidation products enhanced the expression of the Nrf2-controlled antioxidant enzymes HO-1 and GCL in HepG2 cells (Gao et al. 2007) and glutathione peroxidase, glutathione reductase, GST, and catalase in mouse liver (Demos et al. 1992). The enhancement in the cellular antioxidant potential by n-3 LCPUFA results in increased liver GSH content and diminished lipid peroxidation extent in mice (Gao et al. 2007), as well as in rats subjected to IR (Zúñiga et al. 2010) or mice given a high-fat diet (Valenzuela et al. 2012).

n-3 LCPUFA-INDUCED ANTI-INFLAMMATORY RESPONSES

Dietary n-3 LCPUFA supplementation can diminish the production of inflammatory cytokines from activated immune cells, a process associated with arachidonic acid (C20:4n-6; ARA) release from cell membranes at early stages of inflammation through phospholipase A2 activation, leading to the synthesis of bioactive eicosanoids (Fetterman & Zdanowicz, 2009). The well recognized anti-inflammatory action of n-3 LCPUFA has been related to (i) the increased proportion of EPA and DHA in the membranes of inflammatory cells, with reduction in ARA availability for conversion into pro-inflammatory mediators (prostaglandin E2, leukotriene B4, thromboxane A2); (ii) production of n-3 LCPUFA derivatives (prostaglandins I3 and E3, leukotriene B3, thromboxane A3) that are less potent inflammation stimulators and/or effective antagonists toward classic pro-inflammatory mediators; (iii) inhibition of pro-inflammatory transcription factors NF- κ B and AP-1 by n-3 LCPUFA-dependent peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR- α) activation (Fig. 1B); and (iv) enzymatic transformation of n-3 LCPUFA into resolvins, protectins, and epoxide derivatives (Fig. 1B) (Fetterman & Zdanowicz, 2009; Zúñiga et al. 2011).

Previous reports by our group indicate that suppression of early IR-induced liver injury and NF- κ B activation (Zúñiga et al. 2010) was achieved by n-3 LCPUFA supplementation, which was paralleled by enhanced mRNA expression of the PPAR- α -controlled enzymes carnitine-palmitoyl-CoA transferase-I and acyl-CoA oxidase (Zúñiga et al. 2011), thus supporting PPAR- α activation by n-3 LCPUFA. This contention is sustained by the formation of PPAR- α /NF- κ Bp65 transcriptionally inactive nuclear complexes and by the decreased cytosolic I κ B- α phosphorylation found, which contribute to reduce NF- κ B DNA binding activity and pro-inflammatory cytokine signaling (Fig. 1B) (Zúñiga et al. 2011). Besides, activated PPAR- α also interacts with the cJun component of AP-1 forming PPAR- α /AP-1cJun inactive complexes that hinder transactivation of inflammatory genes (Delerive et al. 1999). Interestingly, the anti-inflammatory effect of n-3 LCPUFA may occur via PPAR- α -dependent mechanisms regulated by oxidized EPA and DHA, which readily undergo oxidation due to their polyunsaturated structure (Sethi et al. 2002; Archana et al., 2004). N-3 LCPUFA oxidation products include (i) EPA- and DHA-derived E-series and D-series of resolvins that are synthesized by the cyclo-oxygenase-1 (COX-1) and 5-lipoxygenase (5-LOX) pathway, respectively; and (ii) DHA-derived D protectins formed by 5-LOX activity (Fig. 1B) (de Roos et al. 2009). In addition to PPAR- α activation dependent anti-inflammatory signaling, n-3 LCPUFA oxidation products may signal through alternate mechanisms as shown for resolving E1, which upon binding to the G-protein-coupled receptor (GPCR) ChemR23 and leukotriene B4 receptor attenuates the pro-inflammatory

action of NF- κ B and leukotriene B4 (Arita et al. 2007). Furthermore, EPA and DHA may be transformed into epoxygenated fatty acids by cytochrome P450 NADPH-dependent epoxygenases, such as 17(R), 18(S)-epoxyeicosatetraenoic acid and epoxydocosapentaenoic acids (de Roos et al. 2009) that attenuate inflammation in animal models (Wagner et al. 2011), although their mechanisms of action remain to be studied. In the context of oxidized products of n-3 LCPUFA, these derivatives can react with lysine to produce N ϵ -(propanoyl)lysine, which was proposed as a biomarker of oxidative stress in humans, as evidenced by the increased urinary levels found in diabetic patients compared to healthy subjects (Hisaka et al. 2009).

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

Genomic, redox-independent actions of T₃ on the liver activate the transcription of respiratory genes with enhancement in the rates of O₂ consumption and ROS production at several subcellular sites, as the primary mechanism triggering energy metabolism. Consequently, T₃-induced ROS generation leads to the redox activation of Nrf2, NF- κ B, STAT3, and AP-1 upregulating the transcription of protective genes (Fig. 1A), thus representing a non-genomic secondary mechanism of T₃ action that affords protection against IR liver injury (Videla et al. 2007; Fernández et al. 2007a). Besides these liver PC effects, stimulation of hepatocyte proliferation in rats subjected to 70% and 90% partial hepatectomy (Columbano et al. 2008) or to 50% partial liver transplantation (Taki-Eldin et al. 2011) is achieved by T₃, a primary hepatic mitogen upregulating the expression of cyclin D1, cyclin A (Taki-Eldin et al. 2011), and cyclin kinase-2 (Fernández et al. 2007b). In line with these views, T₃ accelerates the differentiation of hepatic progenitor cells into hepatocytes in vivo, which may have a substantial clinical impact (László et al. 2008). PC by thyroid hormone is not restricted to the liver, considering that long-term L-thyroxine (T₄) administration is known to exert cardioprotection against IR, as assessed by the enhancement in postischemic recovery function (Pantos et al. 2002) or reduction of myocardial infarct size (Kumar et al. 2012). Under these conditions, underlying protective mechanisms include significant diminution of p38 MAPK activation (Pantos et al. 2002) or inhibition of the mitochondrial permeability transition pore opening during reperfusion (Kumar et al. 2012). T₃ administration also preconditioned the kidney against IR injury and malfunction, which is related to HO-1 induction (Li et al. 2011) and lower expression of poly (ADP ribose) polymerase 1 (PARP-1) (Ferreira et al. 2009), with reduced proteinuria and serum urea and creatinine levels, and improved oxidative stress-related parameters compared to non-preconditioned animals. Furthermore, T₄ was recently reported to protect the brain against cerebral IR injury,

which was related to down-regulation of pro-apoptotic Bax and up-regulation of both anti-apoptotic Bcl2 and neurotrophic factors (Genovese et al. 2013). In addition to IR injury, thyroid hormones may also play a critical role for the repair in several tissues and organs subjected to different types of injury, including mechanical injury, nerve transection, chemotherapy-induced toxicity, hyperoxia injury, serum starvation, or wound (for specific references see Mourouzis et al. 2013).

The formation of oxidation products and PPAR- α activation by n-3 LCPUFA represent major mechanisms associated with liver PC against IR injury, triggering antioxidant and anti-inflammatory responses (Fig. 1B). Although the role of n-3 LCPUFA-induced PPAR- α activation in liver PC is supported by studies using PPAR- α agonist WY-14643 in normal (Xu et al. 2008) and steatotic (Teoh et al. 2010) livers from experimental animals subjected to IR, its therapeutic potential in liver surgery in man has not been addressed, while beneficial effects of n-3 LCPUFA supplementation on liver steatosis and hepatic injury are reported in non-alcoholic fatty liver disease patients (Elías-Miró et al. 2012).

T₃ and n-3 LCPUFA are hormetic agents with a dose-response phenomenon characterized by beneficial effects in the low dose range (organ PC) and harmful responses at high doses (thyrotoxicosis or gastrointestinal upset/increased bleeding time, respectively), whose underlying mechanisms of action must be fully understood before transfer to clinical application (Videla, 2010). Considering (i) that IR liver injury is a multi-step phenomenon; and (ii) that T₃ and n-3 LCPUFA afford liver PC through similar and distinct molecular mechanisms (Fig. 1), combination of protective therapies is advisable. This aspect was recently addressed by our group by reducing single T₃ dosage from 0.1 mg/kg (Fernández et al. 2007a) to 0.05 mg/kg and shortening n-3 LCPUFA supplementation (300 mg/kg/day) from 7 to 3 days, which are non-PC protocols when applied separately, but afford protection against IR injury upon combined administration, thus suggesting a reinforcing behavior (Mardones et al. 2012). Besides, the combination of IPC and IPostC protocols reduce IR liver injury more effectively by increasing the activity of ROS scavengers and antioxidants, with utilization of proanthocyanidins from grape seed improving the oxidation resistance in combined IPC and IPostC groups (Song et al. 2012). Another important issue to be considered regarding protective mechanisms in liver PC is energy availability. As indicated in the Introduction, the liver exhibits a rather high energy requirement to perform metabolic, secretory, and excretory functions under physiological conditions, which is further increased to effectively support PC mechanisms. These include ATP demands for the expression of antioxidant, anti-apoptotic, anti-inflammatory, and acute-phase response proteins,

oxidized biomolecules repair (phospholipids, DNA) or resynthesis (proteins) mechanisms, and promotion of hepatocyte and Kupffer-cell proliferation, which are needed to cope with the damaging processes set in by IR. These considerations led to the proposal that upregulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) could constitute the metabolic basis for T₃ liver PC, a downstream component of a protein kinase cascade sensing energy dynamics by reducing anabolic pathways, to prevent excessive ATP utilization, and stimulating catabolic processes, to enhance ATP production (Videla et al. 2012c). This aspect is currently under study in our laboratory.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by FONDECYT, grants 1120034 (to L.A.V.), 1110006 (to V.F.), and 1110043 (to G.T.).

REFERENCES

- Ajamieh H.H., Menéndez S., Martínez-Sánchez G., Canderlío-Jalil E., Re L., Giuliani A., et al. (2004) Effects of ozone oxidative preconditioning on nitric oxide generation and cellular redox balance in a rat model of hepatic ischaemia-reperfusion. *Liver Int.* 24, 55-62.
- Aldrighetti L., Pulitano C., Arru M., Finazzi R., Catena M., Soldini L., et al. (2006) Impact of preoperative steroids administration on ischemia-reperfusion injury and systemic responses in liver surgery: a prospective randomized study. *Liver Transpl.* 12, 941-949.
- Archana M., Ashok C., Sanjeev S. (2004) Oxidized omega-3 fatty acids inhibit NF- κ B activation via a PPAR- α -dependent pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1621-1627.
- Arita M., Ohira T., Sun Y.P., Elangovan S., Chiang N., Serhan C.N. (2007) Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. *J. Immunol.* 178, 3912-3917.
- Arnold S., Goglia F., Kadenbach B. (1998) 3,5-Diiodothyronine binds to subunit Va of Cytochrome-c oxidase and abolishes the allosteric inhibition of respiration by ATP. *Eur. J. Biochem.* 252, 325-330.
- Bahde R., Spiegel H.-U. (2010) Hepatic ischaemia-reperfusion injury from bench to bedside. *Brit. J. Surg.* 97, 1461-1475.
- Carrasco-Chaumel E., Rosello-Catafau J., Bartrons R., Franco-Gou R., Xaus C., Casillas A., et al. (2005) Adenosine monophosphate-activated protein kinase and nitric oxide in rat steatotic liver transplantation. *J. Hepatol.* 43,997-1006.
- Casillas-Ramírez A., Mosbah I.B., Ramalho F., Roselló-Catafau J., Peralta C. (2006) Past and future approaches to ischemia-reperfusion lesion associated with liver transplantation. *Life Sci.* 79, 1881-1894.
- Chaudry I.H. (1989) ATP-MgCl₂ and liver blood flow following shock and ischemia. *Prog. Clin. Biol. Res.* 299,19-31.
- Chavin K.D., Fiorini R.N., Shafizadeh S., Cheng G., Wan C., Evans Z., et al. (2004) Fatty acid synthase blockade protects steatotic livers from warm ischemia reperfusion injury and transplantation. *Am. J. Transpl.* 4, 1440-1447.
- Churchill T.A., Green C.J., Fuller B.J. (1995) The importance of calcium-related effects on energetic at hypothermia: effects of membrane-channel antagonists on energy metabolism of rat liver. *Cryobiology* 32,477-486.
- Coito A.J., Buelow R., Shen X.D., Amersi F., Moore C., Volk H.D., et al. (2002) Heme-oxygenase-1 gene transfer inhibits inducible nitric oxide synthase expression and protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 74, 96-102.
- Colletti L.M., Remick D.G., Burtch G.D., Kunkel S.L., Strieter R.M., Campbell Jr D.A. (1990) Role of tumor necrosis alpha in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J. Clin. Invest.* 85,1936-1943.
- Columbano A., Simbula M., Pibiri M., Perra A., Deidda M., Locker J., et al. (2008) Triiodothyronine stimulates hepatocyte proliferation in two models of impaired liver regeneration. *Cell Prolif.* 41, 521-531.
- Cornejo P., Vargas R., Videla L.A. (2013) Nrf2-regulated phase-II detoxification enzymes and phase-III transporters are induced by thyroid hormone in rat liver. *BioFactors* doi: 10.1002/biof.1092, in press.
- Cursio R., Mari B., Louis K., Rostagno P., Saint-Paul M.C., Giudicelli J., et al. (2002) Rat liver injury after ischemia is prevented by a phosphinic matrix metalloproteinase inhibitor. *FASEB J.* 16, 93-95.
- Das M., Das D.K. (2008) Molecular mechanism of preconditioning. *IUBMB Life* 60, 199-203.
- Davis P.J., Leonard J.L., Davis F.B. (2008) Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front. Neuroendocrinol.* 29, 211-218.
- Delerive P., De Bosscher K., Bernard S., Vanden Berghe W., Peters J.M., González F.J., et al. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J. Biol. Chem.* 274, 32048-32054.
- De Roos B., Mavrommatis Y., Brouwer I.A. (2009) Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids: new insights into mechanisms relating to inflammation and coronary heart disease. *Brit. J. Pharmacol.* 158, 413-428.
- de Rougemont O., Lehmann K., Clavien P.A. (2009) Preconditioning, organ preservation, and postconditioning to prevent ischemia-reperfusion injury to the liver. *Liver Transpl.* 15, 1172-1182.
- Demoz A., Willumsen N., Berge R.K. (1992) Eicosapentaenoic acid hypotriglyceridemic dose enhances hepatic antioxidant defense in mice. *Lipids* 27, 968-971.
- Elías-Miró M., Jiménez-Castro M.B., Mendes-Braz M., Casillas-Ramírez A., Peralta C. (2012) The current knowledge of the role of PPAR in hepatic ischemia-reperfusion injury. *PPAR Res.* Article ID 802384, doi:10.1155/2012/802384.
- Fan C., Zwacka R.M., Engelhardt J.F. (1999) Therapeutics approaches for ischemia/reperfusion injury in the liver. *J. Mol. Med.* 77, 577-592.
- Farhood A., McGuire G.M., Manning A.M., Miyasaka M., Smith C.W., Jaeschke H. (1995) Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil-induced ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J. Leukoc. Biol.* 57, 368-374.
- Fernández L., Heredia N., Grande L., Gomez G., Rimola A., Marco A., et al. (2002) Preconditioning protects liver and lung damage in rat liver transplantation: role of xanthine/xanthine oxidase. *Hepatology* 36,562-572.

- Fernández V., Videla L.A. (1989) Thyroid hormone, active oxygen, and lipid peroxidation. In: Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine; volume 1; Miquel J., Quintanilha A.T., Weber H., Eds.; CRC Press: Boca Raton, USA, 105-115.
- Fernández V., Videla L.A. (1993). Influence of hyperthyroidism on superoxide radical and hydrogen peroxide production by rat liver submitochondrial particles. *Free Radic. Res. Commun.* 18, 329-335.
- Fernández V., Tapia G., Varela P., Castillo I., Mora C., Moya F., et al. (2005) Redox up-regulated expression of rat liver manganese superoxide dismutase and Bcl-2 by thyroid hormone is associated with inhibitor of κ B- α phosphorylation and nuclear factor- κ B activation. *J. Endocrinol.* 186, 539-547.
- Fernández V., Castillo I., Tapia G., Romanque P., Uribe-Echevarría S., Uribe M., et al. (2007a) Thyroid hormone preconditioning: protection against ischemia-reperfusion liver injury in the rat. *Hepatology* 45, 170-177.
- Fernández V., Reyes S., Bravo S., Sepúlveda R., Romanque P., Santander G., et al. (2007b) Involvement of Kupffer cell-dependent signaling in T3-induced hepatocyte proliferation in vivo. *Biol. Chem.* 388, 831-837.
- Ferreira C., O'Valle F., Osorio J.M., Moreno J.M., Rodríguez I., Vargas F., et al. (2009) Effect of preconditioning with triiodothyronine on renal ischemia/reperfusion injury and poly (ADP-ribose) polymerase expression in rats. *Transpl. Proc.* 41, 2073-2075.
- Fetterman J.W., Zdanowicz M.M. (2009) Therapeutic potential of n-3 polyunsaturated fatty acids in disease. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 66, 1169-1179.
- Galleano M., Tapia G., Puntarulo S., Varela P., Videla L.A., Fernández V. (2011) Liver preconditioning induced by iron in a rat model of ischemia/reperfusion. *Life Sci.* 89, 221-228.
- Gao L., Wang J., Sekhat K.R., Yin H., Yared N.F., Schneider S.N., et al. (2007) Novel n-3 fatty acid oxidation products activate Nrf2 by destabilizing the association between Keap1 and Cullin3. *J. Biol. Chem.* 282, 2529-2537.
- Genovese T., Impellizzeri D., Ahmad A., Cornelius C., Campolo M., Cuzzocrea S., et al. (2013) Post-ischaemic thyroid hormone treatment in a rat model of acute stroke. *Brain Res.* 1513, 92-102.
- Gloire G., Legrand-Poels S., Piette J. (2006) Nf- κ B activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1493-1505.
- Guo L., Richardson K.S., Tucker L.M., Doll M.A., Hein D.W., Arteel G.E. (2004) Role of the rennin-angiotensin system in hepatic ischemia reperfusion injury in rats. *Hepatology* 40, 583-589.
- Harada H., Wakabayashi G., Takayanagi A., Shimazu M., Matsumoto K., Obara H., et al. (2002) Transfer of the interleukin-1 receptor antagonist gene into rat liver abrogates hepatic ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 74, 1434-1441.
- Hasselgren P.O. (1987) Prevention and treatment of ischemia of the liver. *Surg. Gynecol. Obst.* 164,187-196.
- Hausenloy D.J., Tsang A., Yellon D.M. (2005) The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning. *Trends Cardiovasc. Med.* 15, 69-75.
- Hisaka S., Kato Y., Kitamoto N., Yoshida A., Kubushiro Y., Naito M., et al. (2009) Chemical and immunological identification of propanoyllysine derived from oxidized n-3 polyunsaturated fatty acid. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 1463-1471.
- Ito K., Ozasa H., Sanada K., Horikawa S. (2000) Doxorubicin preconditioning: a protection against rat hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* 31, 416-419.
- Jaeschke H. (2003) Molecular mechanisms of hepatic ischemic-reperfusion injury and preconditioning. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 284, G15-G26.
- Jaeschke H. (2011) Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory injury: present concepts. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 26, 173-179.
- Kaya Y., Coskum T., Aral E., Erkasap N., Var A. (2003) The effect of trimetazidine on liver regeneration after partial hepatectomy under hepatic blood inflow occlusion. *Hepatogastroenterol.* 50, 651-655.
- Kayawake S., Narbaitz R., Kako K.J. (1982) Effects of chloroquine and nifedipine on the phospholipid content and enzyme activity in the subcellular fraction of ischemic rat liver. *Basic Res. Cardiol.* 77, 140-157.
- Koti R.S., Yang W., Dashwood M.R., Davidson B.R., Seifalian A.M. (2002) Effect of ischemic preconditioning on hepatic microcirculation and function in a rat model of ischemia reperfusion injury. *Liver Transpl.* 8, 1182-1191.
- Kumar A., Taliyan R., Sharma P.L. (2012) Evaluation of thyroid hormone pharmacological preconditioning on cardiomyocyte protection against ischemia-reperfusion injury. *Indian J. Pharmacol.* 44, 68-72.
- László V., Dezso K., Baghy K., Papp V., Kovalszky I., Sáfrány G., et al. (2008) Triiodothyronine accelerates differentiation of rat liver progenitor cells into hepatocytes. *Histochem. Cell Biol.* 130,1005-1014.
- Leonarduzzi G., Sottero B., Testa G., Biasi F., Poli G. (2011) New insights into redox-modulated cell signaling. *Curr. Pharm. Des.* 17, 3994-4006.
- Li F., Lu S., Zhu R., Zhou Z., Ma L., Cai L., et al. (2011) Heme oxygenase-1 is induced by thyroid hormone and involved in thyroid hormone preconditioning-induced protection against renal warm ischemia in rat. *Mol. Cell. Endocrinol.* 339, 54-62.
- Mardones M., Valenzuela R., Romanque P., Covarrubias N., Anghileri F., Fernández V., et al. (2012) Prevention of liver ischemia reperfusion injury by a combined thyroid hormone and fish oil protocol. *J. Nutr. Biochem.* 23, 1113-1120.
- Mourouzis I., Politi E., Pantos C. (2013) Thyroid hormone and tissue repair: new tricks for an old hormone? *J. Thyroid Res.* 2013, Article ID 312104, doi:org/10.1155/2013/312104.
- Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A. (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74, 1124-1136.
- Ozaki M., Nakamura M., Teraoka S., Ota K. (1997) Ebselen, a novel antioxidant compound, protects the rat liver from ischemia-reperfusion injury. *Transpl. Int.* 10, 96-102.
- Pantos C.I., Malliopolou V.A., Mourouzis I.S., Karamanoli E.P., Paizis I.A., Steimberg N., et al. (2002) Long-term thyroxine administration protects the heart in a pattern similar to ischemic preconditioning. *Thyroid* 12, 325-329.
- Peralta C., Hotter G., Closa D., Gelpi E., Bulbena O., Rosello-Catafau J. (1997) Protective effect of preconditioning on the injury associated with to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 25, 934-937.

- Peralta C., Fernandez L., Panes J., Sans M., Pique J.M., Gelpi E., et al. (2001) Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat. *Hepatology* 33, 100-113.
- Peralta C., Bulbena O., Xaus C., Prats N., Cutrin J.C., Poli G., et al. (2002) Ischemic preconditioning: a defense mechanism against the reactive oxygen species generated after hepatic ischemia reperfusion. *Transplantation* 73,1203-1211.
- Rodrigo R., Cereceda M., Castillo R., Asenjo R., Zamorano J., Araya J., et al. (2008) Prevention of atrial fibrillation following cardiac surgery: basis for a novel therapeutic strategy based on non-hypoxic myocardial preconditioning. *Pharmacol. Ther.* 118, 104-127.
- Romanque P., Cornejo P., Valdés S., Videla L.A. (2011) Thyroid hormone administration induced rat liver Nrf2 activation: suppression by N-acetylcysteine pretreatment. *Thyroid* 21, 655-662.
- Rüdiger H.A., Clavien P.A. (2002) Tumor necrosis factor-alpha, but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology* 122, 202-210.
- Schwartz H.L., Oppenheimer J.H. (1978) Physiologic and biochemical actions of thyroid hormone. *Pharmacol. Ther.* B 3, 349-376.
- Selzner N., Rüdiger H., Graf R., Clavien P.A. (2003) Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology* 125, 917-936.
- Selzner N., Boehnert M., Selzner M. (2012) Preconditioning, postconditioning, and remote conditioning in solid organ transplantation: basic mechanisms and translational applications. *Transpl. Rev.* 26, 115-124.
- Serafin A., Rosello-Catafau J., Prats N., Xaus C., Gelpi E., Peralta C. (2002) Ischemic preconditioning increases the tolerance of fatty liver to hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Am. J. Pathol.* 161, 587-601.
- Sethi S., Ziouzenkova O., Ni H., Wagner D.D., Plutzky J., Mayadas T.N. (2002) Oxidized omega-3 fatty acids in fish oil inhibit leukocyte-endothelial interactions through activation of PPAR alpha. *Blood* 100, 1340-1346.
- Soltys K., Dikdan G., Koneru B. (2001) Oxidative stress in fatty livers of obese Zucker rats: rapid amelioration and improved tolerance to warm ischemia with tocopherol. *Hepatology* 34, 13-18.
- Song X., Zhang N., Xu H., Cao L., Zhang H. (2012) Combined precondition and postconditioning provides synergistic protection against liver ischemic reperfusion injury. *Int. J. Biol. Sci.* 8, 707-718.
- Sonnenday C.J., Warren D.S., Cooke S.K., Dietz H.C., Montgomery R.A. (2004) A novel chimeric ribozyme vector produces potent inhibition of ICAM-1 expression on ischemic vascular endothelium. *J. Gene Med.* 6, 1394-1402.
- Suzuki S., Toledo-Pereira L.H., Rodríguez F.G., Cejalvo D. (1993) Neutrophil infiltration as an important factor in the liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation* 55, 1265-1272.
- Taki-Eldin A., Zhou L., Xie H.-Y., Chen K.-J., Zhou W., Zhang W., et al. (2011) Triiodothyronine enhances liver regeneration after living donor liver transplantation in rats. *J. Hepatobiliary Pancreat. Sci.* 18, 806-814.
- Wu T.W., Hashimoto N., Au J.X., Wu J., Mickle D.A., Carey D. (1991) Trolox protects rat hepatocytes against oxyradical damage and the ischemic rat liver from reperfusion injury. *Hepatology* 13, 575-580.
- Taki-Eldin A., Zhou L., Xie H.-Y., Chen K.-J., Yu D., He Y., et al. (2012) Triiodothyronine attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury in a partial hepatectomy model through inhibition of proinflammatory cytokines, transcription factors, and adhesion molecules. *J. Surg. Res.* 178, 646-656.
- Tapia G., Fernández V., Pino C., Ardiles L., Videla L.A. (2006) The acute-phase response of the liver in reflation to thyroid hormone-induced redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 1628-1635.
- Teoh N.C., Williams J., Hartley J., Yu J., McCuskey R.S., Farrel G.C. (2010) Short-term therapy with peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist WY-14,643 protects murine fatty liver against ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* 51, 996-1006.
- Tian Y.S., Rong T.Z., Hong Y.L., Min L., Jian P.G. (2013) Pharmacological postconditioning with diazoxide attenuates ischemia/reperfusion-induced injury in rat liver. *Exp. Ther. Med.* 5, 1169-1173.
- Tolba R.H., Putz U., Decker D., Dombrowski F., Lauschke H. (2003) L-Carnitine ameliorates abnormal vulnerability of steatotic rat livers to cold ischemic preservation. *Transplantation* 76,1681-1686.
- Valenzuela R., Videla L.A. (2010) The importance of the long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in development of non-alcoholic fatty liver associated with obesity. *Food Funct.* 2, 644-648.
- Valenzuela R., Espinosa A., González-Mañán D., D'Espessailles A., Fernández V., Videla L.A., et al. (2012) N-3 Long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation significantly reduces liver oxidative stress in high fat induced steatosis. *PLoS ONE* 7(10): e46400, doi:10.1371/journal.pone.0046400.
- Videla L.A., Fernández V., Tapia P., Varela P. (2007) Thyroid hormone calorogenesis and mitochondrial redox signaling: upregulation of gene expression. *Front. Biosci.* 12, 1220-1228.
- Videla L.A., Fernández V. (2009) Redox signaling in thyroid hormone action: a novel strategy for liver preconditioning. In: *Thyroid Hormones: Functions, Related Diseases and Uses*; Kuehn F.S., Lozada M.P., Eds.; Nova Science Publishers, Inc.: New York, USA, 49-74.
- Videla L.A. (2010) Hormetic responses of thyroid hormone calorogenesis in the liver: association with oxidative stress. *IUBMB Life* 62, 460-466.
- Videla L.A., Cornejo P., Romanque P., Santibáñez C., Castillo I., Vargas R. (2012a) Thyroid hormone-induced cytosol-to-nuclear translocation of rat liver Nrf2 is dependent on Kupffer cell functioning. *The Scientist. World J. Article ID 301494*, doi: 10.1100/2012/301494.
- Videla L.A., Cornejo P., Castillo I., Romanque P. (2012b) Thyroid hormone-induced regulatory interrelations in rat liver Nrf2-Keap1 signaling related to antioxidant enzyme expression. In: *Advances in Medicine and Biology*; volume 55; Berhardt L.V., Ed.; Nova Science Publishers, Inc.: New York, USA,179-191.
- Videla L.A., Fernández V., Cornejo P., Vargas R. (2012c) Metabolic basis for thyroid hormone liver preconditioning: upregulation of AMP-activated protein kinase signaling. *The Scientist. World J. Article ID 475675*, doi:10.1100/2012/475675.
- Wagner K., Inceoglu B., Hammock B.D. (2011) Soluble epoxide hydrolase inhibition, epoxygenated fatty acids and nociception. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 96, 76-83.
- Xu S.Q., Li Y.H., Hu S.H., Chen K., Dong L.Y. (2008) Effects of WY14643 on hepatic ischemia reperfusion injury in rats. *World J. Gastroenterol.* 14, 6936-6942.

Yu S.Y., Chiu J.H., Yanf S.D., Yu H.Y., Hsieh C.C., Chen P.J., et al. (2005) Preconditioned hyperbaric oxygenation protects the liver against ischemic-reperfusion injury in rats. *J. Surg. Res.* 128, 28-36.

Zhang D.D. (2006) Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab. Rev.* 38, 769-789.

Zhong Z., Thurman R.G. (1995) A fish oil diet minimizes hepatic reperfusion injury in the low-flow, reflow liver perfusion model. *Hepatology* 22, 929-935.

Zúñiga J., Venegas F., Villarreal M., Núñez D., Chandía M., Valenzuela R., et al. (2010) Protection against in vivo liver ischemia-reperfusion injury by n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in the rat. *Free Radic. Res.* 44, 854-863.

Zúñiga J., Cancino M., Medina F., Varela P., Vargas R., Tapia G., et al. (2011) N-3 PUFA supplementation triggers PPAR- α activation and PPAR- α /NF- κ B interaction: anti-inflammatory implications in liver ischemia-reperfusion injury. *PLoS ONE* 6(12): e28502, doi:10.1371/journal.pone.0028502.

ARTÍCULO DE REVISIÓN

EL TRANSPORTADOR DE SEROTONINA: VARIANTES GENÉTICAS Y TRASTORNOS NEUROPSIQUIÁTRICOS

(Serotonin transporter: Gene variants and neuropsychiatric disorders)

Pablo R. Moya

Centro de Neurobiología y Plasticidad Cerebral, Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias
Universidad de Valparaíso, Chile

RESUMEN

El gen *SLC6A4* codifica el transportador de serotonina SERT. Desde el descubrimiento del rol de polimorfismos del gen *SLC6A4* – que codifica SERT– en el comportamiento humano (1) , se ha recabado una gran cantidad de información respecto al rol de variantes de *SLC6A4* en trastornos neuropsiquiátricos y otras patologías, así como de sus implicancias farmacogenómicas (2). En esa breve revisión, se discuten los principales descubrimientos acerca de variantes de *SLC6A4*, su impacto funcional y sus roles sugeridos en trastornos neuropsiquiátricos y de neurodesarrollo.

Palabras Claves: serotonina, 5-HT, SERT, 5-HTTLPR

Publicado por la Sociedad de Farmacología de Chile

SEROTONINA Y SERT

5-HT es un neuromodulador monoaminérgico que controla una plétora de procesos fisiológicos y comportamientos, incluyendo emocionalidad, sueño, locomoción, percepción, cognición, agresión, conducta sexual y apetito. Tal notable diversidad de roles puede explicarse, a grueso modo, por dos características clave del sistema 5-HTérgico: a) su organización anatómica, donde los cuerpos neuronales 5-HTérgicos, agrupados en los núcleos del Rafe del tronco encefálico, se proyectan a virtualmente todas las regiones del sistema nervioso, y b) la diversidad molecular y distribución celular diferencial de los catorce subtipos de receptores de 5-HT, expresados en el tejido nervioso y otros órganos (3).

SERT es una proteína clave del sistema 5-HTérgico que regula la disponibilidad del neuromodulador en la sinapsis. SERT pertenece al grupo de transportadores neuronales de membrana de sustrato específico Na^+/Cl^- dependiente, perteneciente a la familia de genes *SLC6*. Al recapturar 5-HT, y así regular la magnitud y alcance de las respuestas al neurotransmisor, SERT participa en el ajuste fino de las

sinapsis 5-HTérgicas cerebrales, así como en sus acciones periféricas. Interesantemente, la mayor expresión de SERT se encuentra en regiones corticales y límbicas implicadas en comportamiento y estados emocionales (2).

Los inhibidores selectivos de recaptura de serotonina (selective serotonin reuptake inhibitors, SSRIs) son fármacos que bloquean SERT, tales como paroxetina, sertralina, citalopram y escitalopram. Los SSRIs constituyen el frente de batalla del tratamiento antidepresivo, y están dentro de los fármacos más prescritos para enfermedades neuropsiquiátricas (2, 4). Al bloquear SERT, los SSRIs aumentan la disponibilidad de 5-HT y su acción sobre receptores de 5-HT, gatillando una serie compleja – y aun no completamente entendida– de cambios moleculares que subyacen a su eficacia antidepresiva, que incluyen desensibilización del transportador y receptores, cambios a nivel de transducción de señal, activación de neurotrofinas y neurogénesis (5). Debido a esto, SERT se ha convertido en uno de los blancos moleculares más explotados en farmacoterapia.

Correspondencia a: Dr. Pablo R. Moya, Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso. Av. Gran Bretaña 1111, Playa-Ancha, Valparaíso, Chile. Teléfono: 56-32-2508039. Correo Electrónico: pablo.moya@uv.cl

VARIACIONES GENÉTICAS DE *SLC6A4*

El gen humano *SLC6A4*, que codifica SERT, es una región de ~40 Kb, localizado en el cromosoma 17q11.2 y se compone de catorce exones (Figura 1). La secuencia de su transcrito predice una proteína de 630 aminoácidos contiene doce dominios transmembrana (4).

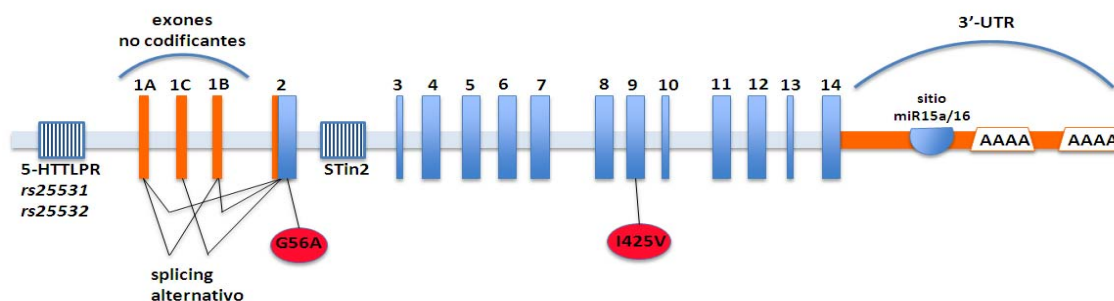
Variantes del promotor de *SLC6A4*: El primer reporte de un polimorfismo en la región 5' de *SLC6A4* fue descrita el año 1996 (6); los autores denominaron a este polimorfismo como la "región polimórfica asociada al transportador de serotonina (5-HT Transporter-Linked Polymorphic Region, 5-HTTLPR). 5-HTTLPR consiste de una inserción de 44 bp (*long*, L) o su eliminación (*short*, S) dentro de una serie de elementos repetitivos localizados ~1kb río arriba del sitio de inicio de transcripción. Los alelos L y S del 5-HTTLPR tienen distintas eficiencias transcripcionales, siendo S comparativamente menos eficaz que L. Cuando los mismos autores descubrieron que el alelo S del 5-HTTLPR estaba asociado con rasgos de personalidad relacionados a ansiedad y depresión, se produjo un avance importantísimo en el área de la genética psiquiátrica (1). Se ha demostrado que el 5-HTTLPR afecta la expresión de SERT por diversas metodologías, incluyendo experimentos con genes reporteros, el uso de radioligandos de SERT en linfoblastos, plaquetas y tejido cerebral post-mortem, mediciones cronoamperométricas de 5-HT extracelular, así como también con estudios de imagenología en humanos midiendo potencial de unión de ligandos en cerebro (2, 6, 7). En los últimos años, el 5-HTTLPR ha sido refinado en detalle: el 2006, Hu y colaboradores demostraron que el alelo G del SNP *rs25531*, que se presenta casi siempre en fase con el alelo L del 5-HTTLPR, atenúa la actividad transcripcional (8). En 2008, Wendland, Moya y colaboradores demostraron que el alelo T del SNP *rs25532*, disminuye aún más la actividad del 5-HTTLPR/*rs25531* (9).

Splicing alternativo: Los exones 1A, 1B y 1C son exones no codificantes los cuales, vía un mecanismo de *splicing* alternativo, regulan la expresión tejido-específica de SERT. La variante de *splicing* que posee solamente el exón 1A dirige la expresión preferencial en tejido del sistema nervioso central (SNC) y medula adrenal; las variantes 1A y 1A+1B son expresadas a niveles similares en corazón y estómago, mientras que la variante 1C es primordialmente expresada en tejido digestivo y tiene una muy baja expresión en corazón (10).

Variante intrónica: Consiste en una repetición en tándem de número variable (*variable number of tandem repeats*, VNTR) de un elemento de 16-17 bp, presente en el intrón 2 de *SLC6A* (STin2). Este polimorfismo presenta los alelos STin2.12, STin2.10 y STin2.9, determinados por el número de repeticiones, y modifican la expresión de SERT de manera directamente proporcional al largo del VNTR (11). Este efecto diferencial ha sido demostrado que ocurre por la alteración de la respuesta a los factores de transcripción YB-1 y CTCF (11, 12).

Señales de poliadenilación: Existen dos señales de poliadenilación en la región 3' no traducida de *SLC6A4*, localizadas a 567 pares de bases (bp) y 690 bp río abajo del codón de término, y su uso diferencial define dos RNA mensajeros de distinto largo. Cabe mencionar que estos dos sitios de poliadenilación también son encontrados en ratón (*Mus musculus*) con un altísimo grado de similitud de secuencia, sugiriendo un rol evolutivo conservado (12, 13). Se ha descrito que el polimorfismo de nucleótido único (*single nucleotide polymorphism*, SNP) *rs3813034* modifica la tasa relativa de uso entre estas dos señales, donde el alelo G reduce el uso de la señal de poliadenilación más distal (14). Notablemente, *rs3813034* ha sido asociado a trastorno de pánico, siendo los portadores del alelo G los que presentan un riesgo aumentado (15).

Figure 1. Diagrama de la estructura genética de *SLC6A4* y las principales variantes genéticas descritas en el texto.



Muy recientemente, se demostró que uno de los roles funcionales que posee la señal de poliadenilación distal de SERT es su interacción con la ribo proteína heteronuclear K (16).

Sitio de unión a microRNA: En 2010, Baudry y colaboradores encontraron que miR-16 es un regulador post-transcripcional de SERT en ratones (17). Moya y colaboradores replicaron este resultado, y demostraron que miR-16, así como también miR-15a son represores funcionales de la expresión de SERT en células humanas y de rata (18). Cabe mencionar que los niveles de miR-16 pueden ser regulados por el SSRI fluoxetina, sugiriendo que este – y quizás otros- microRNA puede ser un efector central que regule los cambios neuroadaptativos inducidos por los antidepresivos (17). No ha sido explorado aún el efecto de fluoxetina sobre miR-15a, ni tampoco si su efecto regulatorio sobre miR-16 es un mecanismo común de todos los SSRIs. Cabe destacar que este sitio de unión a miR-15a/16 esta localizado muy próximo a uno de los sitios de poliadenilación, por lo que resultaría muy interesante explorar las consecuencias funcionales a nivel de expresión de SERT, a nivel combinatorio, del uso alternativo de señales de poliadenilación respecto a la actividad regulatoria mediada por microRNAs.

VARIANTES NO-SINÓNIMAS (CODIFICANTES) EN *SLC6A4*

Se han descrito variantes no-sinónimas e infrecuentes de SERT en Trastorno Obsesivo-Compulsivo (*Obsessive-Compulsive Disorder*, OCD), síndrome de Tourette, autismo y depresión.

Una mutación que cambia el aminoácido Isoleucina en la posición (inferida) 425 (de SERT por Valina fue detectada originalmente en dos familias distintas que presentaban OCD y enfermedades relacionadas (19). SERT I425V se localiza en la región trans-membrana TM8 (inferida), y ha sido sugerido que la mutación modifica la estructura secundaria de hélice alfa, afectando el transporte. La caracterización funcional de esta mutación demostró que SERT I425V otorga un aumento de función, y esto ocurre por cambios en la regulación por cGMP y óxido nítrico, doblando el transporte normal de 5-HT (19, 20). Este descubrimiento es particularmente relevante desde la perspectiva fisiopatológica, puesto que dicha hiperfuncionalidad de SERT se ajusta bien a la hipótesis 5-HTérgica de OCD, y con el hecho que los inhibidores de recaptura de serotonina constituyen la única farmacoterapia disponible para OCD.

En un trabajo recientemente publicado, Moya y colaboradores detectaron SERT I425V en una familia con síndrome de Tourette, una patología de neurodesarrollo que posee características comunes con OCD.

Colectivamente, considerando como condición el espectro OCD/síndrome de Tourette, se tiene que a la fecha SERT I425V ha sido detectado en 1.57% de los casos, mientras que la población control, sólo tres individuos de un total de 1958 genotipados son portadores de la mutación ($X^2=15.03$, $P<0.0001$, $OR=9.0$)(21).

El SNP *rs6355* cambia la Glicina en posición (inferida) 65 por Alanina (G65A). Esta variante ha sido encontrada de manera sistemática en pacientes con autismo. Cabe destacar que G65A ha sido asociada a rasgos rígido-compulsivo, lo que sugiere una superposición fenotípica con OCD, así como un posible nexo común con alteraciones en la señalización 5-HTérgica (22).

La mutación SERT L255M cambia el aminoácido Leucina en posición 255 (inferida) por Metionina. Esta mutación fue encontrada en un paciente con depresión psicótica, que además poseía el genotipo SS para el 5-HTTLPR (23). No existe información funcional para esta mutación, probablemente por el hecho que fue encontrada en tan solo un paciente, y que la posición 255 predice que el cambio ocurren en un loop extracelular, lejos de sitios de glicosilación y fosforilación descritos en SERT.

IMPLICANCIAS DE LAS VARIANTES GENÉTICAS DE *SLC6A4* EN TRASTORNOS NEUROPSIQUIÁTRICOS

Dada su participación en una amplia gama de procesos fisiológicos, no es extraño que las alteraciones del sistema 5-HTérgico estén implicadas en la fisiopatología de muchos trastornos neuropsiquiátricos. Como se mencionó anteriormente, la investigación original de Lesch y colaboradores demostró que la expresión y función reducidas de SERT, que resultan del alelo S del 5-HTTLPR, están asociadas a rasgos de personalidad relacionados a ansiedad y depresión(1). A partir de este trabajo seminal, se ha acumulado una cantidad enorme de información a partir de estudios que implican al 5-HTTLPR en trastornos neuropsiquiátricos (al 23/09/2013, la búsqueda en Pubmed de “5-HTTLPR psychiatry” arroja 600 publicaciones).

Varias de las asociaciones iniciales de variantes de *SLC6A4* con trastornos neuropsiquiátricos han sido replicadas posteriormente en meta-análisis, específicamente de trastorno bipolar afectivo (24), esquizofrenia(25), autismo(26), adicción, depresión y ansiedad (27), OCD (28-30) y déficit atencional con trastorno de hiperactividad (31). Existen otros trastornos y enfermedades que se han descrito estar asociados a variantes de *SLC6A4*, incluyendo síndrome de muerte súbita infantil, migraña, enfermedades musculoesqueléticas, infarto al miocardio, hipertensión pulmonar, y trastorno de colon irritable (2, 4, 7). Sin embargo, la inmensa mayoría de los estudios han investigado el 5-HTTLPR “clásico”, descuidando el efecto que poseen *rs25531* y *rs25532* sobre la actividad de este

locus, lo que puede explicar la ausencia de replicación de los resultados iniciales en algunos estudios posteriores (2).

CONCLUSIONES

La contribución genética al temperamento humano y a rasgos comportamentales, tales como consumo de alcohol, dominancia y ansiedad, han sido establecidas en humanos y otras especies, lo que refleja muy probablemente fuerzas selectivas en nuestros ancestros. Como se ha descrito en esta revisión, el 5-HTTLPR es un elemento regulatorio de alta flexibilidad (y baja complejidad) que no debe ser considerado como bi-alélico (S vs L) sino que como tri-alélico (5-HTTLPR/rs25531) y además modulado por rs25532. Actualmente, determinación genética de dichas variantes es de muy bajo costo y no ofrece mayores desafíos técnicos respecto análisis molecular del 5-HTTLPR clásico. Los esfuerzos experimentales, por tanto, deben realizarse hacia el análisis de múltiples variantes de *SLC6A4* de forma simultánea.

El análisis de las variantes genéticas que afectan la expresión y función de SERT permite comprender, al menos en parte, cómo las alteraciones del sistema 5-HTérgico influyen el riesgo a trastornos afectivos y comportamentales. Es importante mencionar que dicho riesgo ocurre fundamentalmente a través de interacciones genético-ambientales, cuyo análisis está fuera del objetivo de esta revisión.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, et al. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science*. 1996 Nov 29;274(5292):1527-31. PubMed PMID: 8929413.
2. Murphy DL, Moya PR. Human serotonin transporter gene (SLC6A4) variants: their contributions to understanding pharmacogenomic and other functional GxG and GxE differences in health and disease. *Current opinion in pharmacology*. 2011 Feb;11(1):3-10. PubMed PMID: 21439906. Pubmed Central PMCID: 3487694.
3. Baumgarten HG, Göthert M, Aghajanian GK. Serotonergic neurons and 5-HT receptors in the CNS. Berlin ; New York: Springer; 1997. xxx, 767 p. p.
4. Murphy DL, Moya PR, Wendland JR, Timpano KR. Genetic contributions to obsessive-compulsive disorder (OCD) and OCD-related disorders In: Nurnberger J, Berrettini W, editors. *Principles of Psychiatric Genetics*. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2012. p. 121-33.
5. Carr GV, Lucki I. The role of serotonin receptor subtypes in treating depression: a review of animal studies. *Psychopharmacology*. 2011 Feb;213(2-3):265-87. PubMed PMID: 21107537. Pubmed Central PMCID: 3374933.
6. Heils A, Teufel A, Petri S, Stober G, Riederer P, Bengel D, et al. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *Journal of neurochemistry*. 1996 Jun;66(6):2621-4. PubMed PMID: 8632190.
7. Murphy DL, Lesch KP. Targeting the murine serotonin transporter: insights into human neurobiology. *Nature reviews Neuroscience*. 2008 Feb;9(2):85-96. PubMed PMID: 18209729.
8. Hu XZ, Lipsky RH, Zhu G, Akhtar LA, Taubman J, Greenberg BD, et al. Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. *American journal of human genetics*. 2006 May;78(5):815-26. PubMed PMID: 16642437. Pubmed Central PMCID: 1474042.
9. Wendland JR, Moya PR, Kruse MR, Ren-Patterson RF, Jensen CL, Timpano KR, et al. A novel, putative gain-of-function haplotype at SLC6A4 associates with obsessive-compulsive disorder. *Human molecular genetics*. 2008 Mar 1;17(5):717-23. PubMed PMID: 18055562.
10. Ozsacar N, Santha E, Hoffman BJ. Alternative non-coding exons support serotonin transporter mRNA expression in the brain and gut. *Journal of neurochemistry*. 2002 Jul;82(2):336-44. PubMed PMID: 12124434.
11. MacKenzie A, Quinn J. A serotonin transporter gene intron 2 polymorphic region, correlated with affective disorders, has allele-dependent differential enhancer-like properties in the mouse embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999 Dec 21;96(26):15251-5. PubMed PMID: 10611371. Pubmed Central PMCID: 24806.
12. Ali FR, Vasilou SA, Haddley K, Paredes UM, Roberts JC, Miyajima F, et al. Combinatorial interaction between two human serotonin transporter gene variable number tandem repeats and their regulation by CTCF. *Journal of neurochemistry*. 2010 Jan;112(1):296-306. PubMed PMID: 19860858. Pubmed Central PMCID: 2848977.
13. Gyawali S, Subaran R, Weissman MM, Hershkowitz D, McKenna MC, Talati A, et al. Association of a polyadenylation polymorphism in the serotonin transporter and panic disorder. *Biological psychiatry*. 2010 Feb 15;67(4):331-8. PubMed PMID: 19969287. Pubmed Central PMCID: 2980348.
14. Battersby S, Ogilvie AD, Blackwood DH, Shen S, Muqit MM, Muir WJ, et al. Presence of multiple functional polyadenylation signals and a single nucleotide polymorphism in the 3' untranslated region of the human serotonin transporter gene. *Journal of neurochemistry*. 1999 Apr;72(4):1384-8. PubMed PMID: 10098839.
15. Hartley CA, McKenna MC, Salman R, Holmes A, Casey BJ, Phelps EA, et al. Serotonin transporter polyadenylation polymorphism modulates the retention of fear extinction memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012 Apr 3;109(14):5493-8. PubMed PMID: 22431634. Pubmed Central PMCID: 3325655.
16. Yoon Y, McKenna MC, Rollins DA, Song M, Nuriel T, Gross SS, et al. Anxiety-associated alternative polyadenylation of the serotonin transporter mRNA confers translational regulation by hnRNPK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013 Jul 9;110(28):11624-9. PubMed PMID: 23798440. Pubmed Central PMCID: 3710847.
17. Baudry A, Mouillet-Richard S, Schneider B, Launay JM, Kellermann O. miR-16 targets the serotonin transporter: a new facet for adaptive responses to antidepressants. *Science*. 2010 Sep 17;329(5998):1537-41. PubMed PMID: 20847275.
18. Moya PR, Wendland JR, Salemme J, Fried RL, Murphy DL. miR-15a and miR-16 regulate serotonin transporter expression in human placental and rat brain raphe cells. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013 Apr;16(3):621-9. PubMed PMID: 22564678. Epub 2012/05/09. eng.

19. Ozaki N, Goldman D, Kaye WH, Plotnicov K, Greenberg BD, Lappalainen J, et al. Serotonin transporter missense mutation associated with a complex neuropsychiatric phenotype. *Molecular psychiatry*. 2003 Nov;8(11):933-6. PubMed PMID: 14593431.
20. Prasad HC, Zhu CB, McCauley JL, Samuvel DJ, Ramamoorthy S, Shelton RC, et al. Human serotonin transporter variants display altered sensitivity to protein kinase G and p38 mitogen-activated protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005 Aug 9;102(32):11545-50. PubMed PMID: 16055563. Pubmed Central PMCID: 1183547.
21. Moya PR, Wendland JR, Rubenstein LM, Timpano KR, Heiman GA, Tischfield JA, et al. Common and rare alleles of the serotonin transporter gene, SLC6A4, associated with Tourette's disorder. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2013 Aug;28(9):1263-70. PubMed PMID: 23630162. Pubmed Central PMCID: 3766488.
22. Prasad HC, Steiner JA, Sutcliffe JS, Blakely RD. Enhanced activity of human serotonin transporter variants associated with autism. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2009 Jan 27;364(1514):163-73. PubMed PMID: 18957375. Pubmed Central PMCID: 2674096.
23. Di Bella D, Catalano M, Balling U, Smeraldi E, Lesch KP. Systematic screening for mutations in the coding region of the human serotonin transporter (5-HTT) gene using PCR and DGGE. *American journal of medical genetics*. 1996 Nov 22;67(6):541-5. PubMed PMID: 8950411.
24. Cho HJ, Meira-Lima I, Cordeiro Q, Michelon L, Sham P, Vallada H, et al. Population-based and family-based studies on the serotonin transporter gene polymorphisms and bipolar disorder: a systematic review and meta-analysis. *Molecular psychiatry*. 2005 Aug;10(8):771-81. PubMed PMID: 15824745.
25. Fan JB, Sklar P. Meta-analysis reveals association between serotonin transporter gene STin2 VNTR polymorphism and schizophrenia. *Molecular psychiatry*. 2005 Oct;10(10):928-38, 891. PubMed PMID: 15940296.
26. Kistner-Griffin E, Brune CW, Davis LK, Sutcliffe JS, Cox NJ, Cook EH, Jr. Parent-of-origin effects of the serotonin transporter gene associated with autism. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*. 2011 Mar;156(2):139-44. PubMed PMID: 21302342. Pubmed Central PMCID: 3438509.
27. Wray NR, James MR, Gordon SD, Dumenil T, Ryan L, Coventry WL, et al. Accurate, Large-Scale Genotyping of 5HTTLPR and Flanking Single Nucleotide Polymorphisms in an Association Study of Depression, Anxiety, and Personality Measures. *Biological psychiatry*. 2009 Sep 1;66(5):468-76. PubMed PMID: 19541292. Pubmed Central PMCID: 3060567.
28. Stewart SE, Mayerfeld C, Arnold PD, Crane JR, O'Dushlaine C, Fagerness JA, et al. Meta-analysis of association between obsessive-compulsive disorder and the 3' region of neuronal glutamate transporter gene SLC1A1. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*. 2013 Jun;162B(4):367-79. PubMed PMID: 23606572.
29. Taylor S. Molecular genetics of obsessive-compulsive disorder: a comprehensive meta-analysis of genetic association studies. *Molecular psychiatry*. 2013 Jul;18(7):799-805. PubMed PMID: 22665263.
30. Bloch MH, Landeros-Weisenberger A, Rosario MC, Pittenger C, Leckman JF. Meta-analysis of the symptom structure of obsessive-compulsive disorder. *The American journal of psychiatry*. 2008 Dec;165(12):1532-42. PubMed PMID: 18923068.
31. Gizer IR, Ficks C, Waldman ID. Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Human genetics*. 2009 Jul;126(1):51-90. PubMed PMID: 19506906.

NEFROPATÍA DIABÉTICA: ASPECTOS PATOGENÉTICOS E IMPLICANCIAS TERAPÉUTICAS

Sergio Mezzano

Departamento de Nefrología, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

RESUMEN

La Nefropatía Diabética (ND) es una complicación microvascular mayor de la Diabetes. El aumento epidémico de la Diabetes tipo 2, es la principal causa de Enfermedad Renal Crónica en el mundo, y de aproximadamente el 40% de los pacientes que ingresan a diálisis crónica. Se estima que hasta un tercio de los pacientes con Diabetes tipo 1 y tipo 2, pueden desarrollar nefropatía diabética. Se ha postulado que la excesiva ingesta de fructosa puede ser un agente causal del síndrome metabólico y de la Diabetes Tipo 2.

La ND se caracteriza por cambios morfológicos y ultraestructurales en el riñón, incluyendo expansión de matriz mesangial, alteración de la barrera de filtración glomerular y daño podocitario, cuya manifestación clínica cardinal es la aparición de proteinuria. La magnitud de la proteinuria, la activación intrarenal del sistema renina angiotensina aldosterona (RAS) y el estrés oxidativo desempeñan un rol clave como mediadores de inflamación a través de la activación del factor de transcripción NF-κB. Ello conlleva a la generación de citoquinas proinflamatorias y profibrogénicas que conducen al daño túbulo-intersticial y progresión de la enfermedad renal.

Nuevas evidencias destacan el rol de otros componentes del RAS en la patogenia de la ND (Pro renina, ECA2 y Angio 1-7) y que NF-κB activado también es inducido por varias citoquinas de la familia TNF.

El estrecho control glicémico, el adecuado control de la hipertensión, de la hiperlipidemia, y el estricto control de la proteinuria con inhibidores del RAS, logran sólo retardar la progresión de la enfermedad. Están emergiendo por ello nuevas terapias que modulan las vías de señalización intracelulares, como la vía JAK-STAT que reduce la actividad inflamatoria y la vía de señalización Nrf2, que reduce la actividad oxidativa.

Publicado por la Sociedad de Farmacología de Chile

CONGRESO 2013: CONFERENCIA

METABOLIC ABNORMALITIES IN PCOS – EFFECT OF NON-PHARMACOLOGICAL TREATMENT

Elisabet Stener-Victorin, Manuel Maliqueo, Anna Benrick, Julia Johansson and Louise Mannerås Holm.

Institute of Neuroscience and Physiology, Department of Physiology, Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg, Sweden

ABSTRACT

High levels of circulating androgens in women are associated with insulin resistance, and women with PCOS have at least a 4-fold increased risk of developing type 2 diabetes (T2D). We have previously demonstrated that women with PCOS have enlarged adipocytes and that these, together with low circulating adiponectin, are the strongest factors explaining insulin resistance in women with PCOS. This highlights the role of adipose tissue dysfunction as an important mechanism that may negatively affect metabolic health in these women.

Treatment of metabolic dysfunction – Changes in diet and lifestyle are the first choice for improving and preventing T2D, while metformin treatment is prescribed to those with impaired glucose tolerance who do not respond to lifestyle changes. Metformin is a safe and effective treatment for T2D but it is associated with gastrointestinal side effects.

Recent reviews support the hypothesis that acupuncture has beneficial effects on obesity and insulin sensitivity in T2D with no negative side effects. Studies included in these reviews, however, were underpowered and of poor methodological quality. We performed secondary analyses on metabolic variables in our previous randomized controlled trial and found no effect of acupuncture on insulin sensitivity. However, in our experimental studies on DHT-induced PCOS rats that exhibit polycystic ovaries (PCO), irregular cycles, obesity, and insulin resistance, we found that more frequent acupuncture treatments ameliorated insulin resistance. This effect may involve regulation of adipose and skeletal muscle tissue signaling pathways because acupuncture and exercise each partly restore divergent gene and protein expression associated with insulin resistance, obesity, and inflammation. These and new data on mechanism of action of acupuncture for improvement of metabolic function will be presented at the conference.

Financial Support: *The work was supported by the Swedish Medical Research Council, Hjalmar Svensson Foundation; Adlerbert Research Foundation; Swedish federal government under the LUA/ALF agreement ALFFGBG-136481*

Published by the Chilean Society of Pharmacology

Corresponding author: Dr. Elisabet Stener-Victorin, Institute of Neuroscience and Physiology, Department of Physiology, Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg, Box 434, SE-405 30 Gothenburg, Sweden. E-mail: elisabet.stener-victorin@neuro.gu.se

CONGRESO 2013: CONFERENCIA

LIFE BEYOND MICE - INNATE IMMUNITY WHERE IT REALLY MATTERS

Dirk Werling

Royal Veterinary College, United Kingdom.

ABSTRACT

Immunity to pathogens critically requires pattern-recognition receptors (PRRs) to trigger intracellular signaling cascades that initiate and direct innate and adaptive immune responses. One group of PRRs, the Toll-like receptors (TLRs) are involved in pathogen recognition and initiation of a signalling cascade. Indeed, TLRs mediate recognition of a wide range of microbial products, including LPS, lipoproteins, flagellin, and bacterial DNA, and signaling through TLRs leads to the production of inflammatory mediators. In addition to TLRs, many other surface receptors have been proposed to participate in innate immunity and microbial recognition, and signaling through some of these, for example, C-type lectins, is likely to cooperate with TLR signaling in defining inflammatory responses. Here, I will provide evidence of the importance of the ECD and intracellular TIR domain of TLRs from different species. Indeed, recognition of microbial products is dependent on the extracellular, solenoid structure, but not the intracellular TIR domain. Furthermore, I will provide evidence that the interactions of TLRs with C-type lectin receptors increases uptake of microorganisms, but modulates the subsequent innate immune response. Again, this interaction of PRR is only successful within the context of one species. Furthermore, I will summarise recent advances in the understanding of the roles and mechanisms of these multifunctional receptors and the progress in the use of these receptors as targets for the development of new biotherapeutics and vaccines briefly discussed.

Published by the Chilean Society of Pharmacology

Corresponding author: Dr. Dirk Werling, Molecular Immunology Group, Department of Pathology and Pathogen Biology, Royal Veterinary College, Hawkshead Lane, Hatfield AL9 7TA, UK. E-mail: dwerling@rvc.ac.uk

CONGRESO 2013: SIMPOSIO "RECEPTORES DE CININAS Y PATOLOGÍAS"

LA RESPUESTA DEL NEUTRÓFILO HUMANO A AGENTES QUIMIOTÁCTICOS Y CITOQUINAS ES MODULADA POR EL RECEPTOR B1 DE CININAS (Human neutrophil response to chemotactic agents and cytokines is regulated by the kinin B1 receptor).

Figueroa, C.D.; Matus, C.E.; Barria, F.; Nualart, D.; Ehrenfeld, P.

Laboratorio de Patología Celular, Instituto Anatomía, Histología y Patología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile, Valdivia

Cuando el leucocito neutrófilo es expuesto a mediadores específicos puede adquirir un estado de preactivación que frente a un nuevo contacto, con el mismo mediador u otro distinto, le permite producir una respuesta de mucho mayor magnitud. El neutrófilo humano expresa de forma constitutiva el receptor B1 de cininas (RB1) cuya estimulación aumenta la exposición de integrina CD11b/CD18 y favorece su adhesión al endotelio, la quimiotaxis, y la liberación de proteasas desde gránulos terciarios, secundarios y primarios.

La estimulación de neutrófilos, aislados de voluntarios sanos, con el agonista del RB1 Lysdes[Arg9]bradisinina (LDBK) no incrementa la movilización de $[Ca^{2+}]_i$, aunque se ensaye una amplia gama de concentraciones. Sin embargo, una corta exposición (10 min) de los leucocitos a LDBK, antes de la estimulación con el péptido quimiotáctico fMet-Leu-Phe (fMLP) produce un claro aumento del $[Ca^{2+}]_i$, comparado con los neutrófilos no expuestos a LDBK y estimulados con idénticas concentraciones de fMLP. El aumento del $[Ca^{2+}]_i$ es dependiente de la concentración de LDBK usada, aumentando un 18% y un 30% cuando los neutrófilos son expuestos a 0.1 nM y 100 nM LDBK, respectivamente. La liberación de mieloperoxidasa, elastasa y catepsina G aumenta tres a cinco veces en los leucocitos expuestos a LDBK y a continuación estimulados con fMLP, comparado con las células no expuestas. La fagocitosis de partículas de látex-fluoresceína aumenta al doble cuando los neutrófilos son expuestos a LDBK y luego estimulados con fMLP. La estimulación de los leucocitos con bajas o altas concentraciones de LDBK no incrementa los niveles de especies reactivas de oxígeno, pero su exposición a 1 nM LDBK durante 120 min, incrementa estos niveles en respuesta a citoquinas y fMLP. La capacidad del RB1 para modular la respuesta del leucocito neutrófilo a fMLP y citoquinas sugiere que podría constituirse en un blanco terapéutico para disminuir la actividad del neutrófilo, especialmente durante los episodios agudos de enfermedades crónicas como artritis reumatoide.

Agradecimientos: Financiado por FONDECYT 1110464

RENOPROTECTIVE ROLE OF THE RENAL KALLIKREIN-KININ SYSTEM (Rol renoprotector del sistema caliceína-cininas renal).

Ardiles, L.G.

FACP, Professor, Dpt of Nephrology, Faculty of Medicine, Universidad Austral de Chile, Valdivia, CHILE

Different models of tubulointerstitial damage, included the albumin overload model are followed by salt-sensitive hypertension after exposure to hypersodic diet even when the initial injury has ceased. To understand the effect of kinin system stimulation on blood pressure and to explore its potential renoprotective effects the albumin overload proteinuria model is induced in Sprague-Dawley rats, after receiving a high-potassium diet to enhance activity of the kinin pathway, followed with/without administration of Icatibant to block the kinin B2 receptor (B2R). Potassium treatment increases the synthesis and excretion of tissue kallikrein accompanied by a significant reduction in blood pressure and reduced renal fibrosis and down-regulation of protein and mRNA expression of renal TGF- β compared with rats that did not receive potassium. Participation of the B2R is evidenced by the fact that all beneficial effects are lost in the presence of the B2R antagonist. In vitro experiments using the HK-2 proximal tubule cell line show that treatment of tubular cells with bradykinin reduces the epithelial-mesenchymal transdifferentiation and albumin-induced production of TGF- β , and the effects produced by bradykinin are prevented by pretreatment with the B2R antagonist. These experiments support not only the pathogenic role of the kinin pathway in salt-sensitivity but also sustain its role as a renoprotective, antifibrotic paracrine system that modulates renal levels of TGF- β .

Acknowledgements: DID-UACH and Proyectos Fondecyt 1000584, 1030263, 1070245

CONGRESO 2013: SIMPOSIO “RECEPTORES DE CININAS Y PATOLOGÍAS”

PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES B1 Y B2 DE CININAS EN LA PREVENCIÓN DE LA FIBROSIS CARDIACA: ROL DE LOS FIBROBLASTOS CARDIACOS (Participation of B1 and B2 kinin receptors in cardiac fibrosis prevention: role of cardiac fibroblast).

Díaz-Araya, G.

Laboratorio de Farmacología Molecular Cardiovascular, Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Las cininas DAKD y BK median sus efectos a través de la activación de los receptores B1 y B2 (B1R y B2R) respectivamente. En la literatura existen varios reportes respecto de los efectos cardioprotectores de las cininas, dados principalmente por el uso de los fármacos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, los cuales de manera adicional, inhiben la degradación de las cininas. En animales knock out para el receptor B1R, se ha establecido que la presencia de ese receptor no tendría efecto cardioprotector, el cual mediaría esencialmente respuestas inflamatorias. Sin embargo, se ha establecido que la señalización activada a través de B2R tendría un efecto cardioprotector disminuyendo la dilatación ventricular, reduciendo la muerte por apoptosis de los cardiomiocitos y atenuando la disfunción cardíaca. Finalmente, se ha propuesto que la ausencia de los receptores de cininas promueve el desarrollo de fibrosis cardíaca. EL excesivo depósito de proteínas de la matriz extracelular conduce al desarrollo de fibrosis cardíaca, el cual depende principalmente de la activación de los fibroblastos y miofibroblastos cardíacos. En este sentido, se ha descrito que diversos estímulos de carácter mecánico, neurohumorales, de estrés, etc., conducen al desarrollo de fibrosis cardíaca. En el corazón los miofibroblastos cardíacos sintetizan y secretan mayores niveles de colágeno que los fibroblastos cardíacos; y en este sentido se ha establecido que los miofibroblastos cardíacos expresan mayores niveles de B1R que los fibroblastos cardíacos, mientras que el B2R permanece constante. La activación de los B1R y B2R por sus respectivos agonistas conduce a la liberación de NO y de prostaglandinas, los cuales conducen a la reducción de la síntesis y secreción de colágeno. Lo anterior indica que la activación de fibroblastos y miofibroblasto cardíacos por cininas conduce a un efecto antifibrótico y consecuentemente cardioprotector.

Agradecimientos: Fondecyt 1100443.

Correo electrónico: gadiaz@ciq.uchile.cl

CONGRESO 2013: SIMPOSIO "BIOFÁRMACOS"

SISTEMAS DE EXPRESIÓN DE BIOFÁRMACOS RECOMBINANTES: ALTERNATIVAS ACTUALES VS APLICACIONES FARMACOLÓGICAS (Recombinant biopharmaceuticals expression system: Current alternatives versus pharmacological applications).

Toledo, J.R.¹, Sánchez O.³, Montesino R.¹, Mansilla R.A.^{1,3}, Jiménez S.P.¹, Salgado E.R.¹, Maura-Pérez R.¹, Zaror S.A.¹, González M.¹, Cortez-San Martín M.¹, Salas-Burgos A.², *Cremata J.A.¹.

¹Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos. Departamento de Fisiopatología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción. ²Laboratorio de Diseño de Fármacos. ³Laboratorio de Biofármacos. Departamento de Farmacología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción. **in memoria*

El auge actual de la biotecnología aplicada al desarrollo farmacéutico se basa en la producción recombinante de compuestos de origen proteico con una utilidad farmacológica, como citoquinas y proteínas de interés terapéutico, anticuerpos, y vacunas terapéuticas. Este auge se fundamenta en el desarrollo exponencial de nuevas tecnologías y áreas de estudio de uso transversal, que potencian la investigación biotecnológica, como son la bioinformática, genómica, proteómica, metabolómica, RNA de interferencia, entre otras. El diseño de secuencias genéticas artificiales y la expresión recombinante de biofármacos proteicos permiten optimizar las condiciones de producción y purificación de estas proteínas, en procesos racionales y costo-factibles, que garantizan una aplicación farmacológica eficaz. En estos casos la selección del sistema de expresión u organismo hospedante, resulta determinante para el éxito del proceso y la generación de un biofármaco con una adecuada actividad terapéutica. Siendo la estructura terciaria y los procesamiento post-traduccionales de la proteínas recombinantes terapéuticas, los principales factores que definen su solubilidad, estabilidad y actividad biológica.

Acá describiremos la experiencia y principales resultados obtenidos en nuestro laboratorio tomando como referencia tres biofármacos recombinantes: el factor de crecimiento epidérmico humano, la eritropoyetina humana y el antígeno Cap del circovirus porcino tipo 2. Cada una de estas proteínas se produjeron en sistemas de expresión diferentes en función de su complejidad estructural y aplicación terapéutica. Los resultados obtenidos avalan la selección y el diseño del sistema productivo, demostrando su importancia para la aplicación del biofármaco de interés.

Agradecimientos: FONDEF D09I1262, FONDEF D11I1188, FONDECYT 1110925, Innova-Corfo I+D 13IDL2-18688.

PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES, *IN VITRO* E *IN VIVO*, MEDIANTE EL EMPLEO DE VECTORES ADENOVIRALES (In vitro and in vivo production of recombinant proteins mediated by adenoviral vectors).

Oliberto Sánchez Ramos¹, Fernández García Y.¹, Maura Pérez R.^{1,2}, Aedo Vielma G.¹, Beltrán Ortiz C.¹, Toledo Alonso J.²

¹Laboratorio de Biofármacos. Departamento de Farmacología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción.

²Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos. Departamento de Fisiopatología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción.

La adecuada conformación y actividad biológica de muchas proteínas eucarióticas depende de complejas modificaciones post-traduccionales que solo pueden ser llevadas a cabo por la maquinaria biosintética de células superiores. La producción de esa proteínas usualmente se realiza en cultivos artificiales de células de mamíferos, y en menor medida, en la leche de animales genéticamente modificados. Sin embargo, la generación y caracterización de un animal transgénico o líneas celulares establemente transformados puede ser un proceso largo y laborioso, lo que atenta contra la pronta evaluación del producto recombinante. Los vectores adenovirales son una alternativa emergente para la producción de proteínas recombinantes complejas, en un periodo de tiempo relativamente corto. Los vectores adenovirales son capaces de transducir muy eficientemente un amplio rango de cultivos de células de mamíferos, así como el epitelio glandular mamario de varias especies. A través de la transducción adenoviral se transfieren los transgenes y asegura la síntesis y secreción de grandes cantidades de la molécula de interés. Este procedimiento permite producir proteínas recombinantes complejas a niveles de cientos de miligramos por litro, en el medio de cultivo de células de mamíferos, y a niveles superiores a un gramo por litro, en la leche de mamíferos no transgénicos. Mediante el empleo de esta tecnología nuestro grupo ha logrado producir y caracterizar moléculas tales como: hormona de crecimiento humano (hGH), eritropoyetina humana (EPO), factor VIII de coagulación (FVIII), hemaglutinina del virus de la influenza aviar H5N1 (HA), proteína E2 de la superficie del virus de la peste porcina clásica (E2-PPC), hormona estimuladora de los folículos (FSH), Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF), y antígenos de superficie del virus Andes.

Agradecimientos: Consejo de Estado de la Republica de Cuba, Fondecyt 1110925, Fondef D10I1282

CONGRESO 2013: SIMPOSIO "BIOFÁRMACOS"

DESARROLLO DE HERRAMIENTAS COMPUTACIONALES PARA EL DISEÑO DE BIOFÁRMACOS (Development of computational tools for design biopharmaceuticals).

Alexis Salas Burgos¹, Cáceres Delpiano J.¹, Mansilla R.², Teneb J.², Gutiérrez Medina F.¹, Toledo Alonso J.³, Sánchez Ramos O.².

¹Laboratorio de Diseño de Fármacos. ²Laboratorio de Biofármacos. Departamento de Farmacología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción. ³Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos. Departamento de Fisiopatología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción.

La producción de biofármacos, es decir fármacos que son producidos desde una fuente biológica, incluye a una amplia familia de moléculas de origen proteico, donde destacan la producción de péptidos pequeños, hormonas y moléculas tipo anticuerpos. Existen varios pasos críticos en la producción de biofármacos, centraremos nuestra atención en el diseño de nuevas moléculas con mejoras en propiedades farmacocinéticas específicas como el aumento de la vida media, la selección de líneas celulares productoras, y finalmente el diseño de moléculas tipo anticuerpos con propiedades de secuestro o unión de otras moléculas que generan una terapia. Al respecto nuestro laboratorio, en estrecha colaboración con los grupos de investigación acompañantes del simposio, hemos desarrollado tres herramientas computacionales que han sido utilizadas para el diseño y producción de biofármacos. La primera herramienta corresponde a un software para el diseño de proteínas quiméricas con la capacidad de oligomerizar, esta herramienta permite diseñar dímeros, trímeros y tetrámeros de hormonas o pequeñas proteínas, determinando largos óptimos de secuencias de unión, evaluar estabilidad teórica de los complejos por cálculos con redes elásticas y generar la secuencia nucleotídica de los vectores plasmidiales que los producirían. Una segunda herramienta es un software para el diseño de partidores para realizar PCR-tiempo real para identificar células troncales desde cabras. Este software nos permite diseñar partidores en forma automatizada contra proteínas de superficie de especies sin genomas de referencia basados en similitud con especies relacionadas. Finalmente, un tercer grupo de aplicaciones es el desarrollo de software para la humanización y maduración *in silico* de la afinidad de moléculas tipo anticuerpo. Esta herramienta utiliza el cálculo de matrices de sustitución desde anticuerpos de ratón y desde anticuerpos humanos, con ello genera alineamientos de la secuencia problema y asigna un puntaje de humanizado de la secuencia, y determina punto críticos a modificar para la humanización, en forma paralela utiliza un algoritmo para identificar las regiones hipervariables determinantes de la complementariedad y evalúa su sustitución para aumentar el cambio de energía libre, y con ello aumentar la afinidad.

Agradecimientos: Fondef D10i1282, Conicyt Proyecto Inserción Academia 79112029.

CONGRESO 2013: SIMPOSIO "AUTONOMIC CONTROL OF THE OVARY"

CONTROL OF THE OVARY FUNCTION BY DOPAMINERGIC, NORADRENERGIC AND CHOLINERGIC SYSTEMS IN PRIMATE AND HUMANS: NOVEL INSIGHTS

Artur Mayerhofer

LMU, Anatomy III - Cell Biology, 80802 Munich, Germany.

The human ovary has a rich sympathetic innervation and norepinephrine (NE) and dopamine (DA) were previously detected in homogenates. The ovary lacks parasympathetic innervation but acetylcholine (ACh) is produced by follicular granulosa cells (GCs) and via receptors may influence GCs and oocytes. To what extent catecholamines also reach GCs, which express catecholamine receptors, was not well examined. Yet, we readily found NE and DA in follicular fluids (FF), derived from women undergoing IVF. Surprisingly, metabolites were also detected. Human GCs possess metabolizing enzymes, including intracellular MAO, and a DA-/NE-transporter-mediated, cellular catecholamine uptake was detected. In GCs, NE and DA entailed increases in the generation of reactive oxygen species (ROS). This depended on cellular uptake and metabolism, but not on receptor-activation. Since noxious consequences of NE/DA were not evident for the concentration-range measured in FF, ROS-generation may be an overlooked physiological consequence of NE/DA. Mathematical modeling suggested that ROS levels depend on several factors, including abundance of MAO, uptake and catecholamine levels. Distinct changes in these parameters became apparent when FF and GCs samples from women suffering from polycystic ovarian syndrome (PCOS) were studied. Thus increases in ROS levels due to ovarian catecholamine handling may contribute to PCOS. Ongoing studies on ovarian ACh reveal that several forms of the enzyme ACh-esterase, including the R-splice variant, may regulate ACh level. The R-variant has, however, additional functions, including regulation of cell death. Thus neurotransmitter systems of the human ovary are complex and of relevance for the ovary in health and disease.

Financial Support: DFG

HIGH SYMPATHETIC NERVE ACTIVITY IN WOMEN WITH POLYCYSTIC OVARY SYNDROME - CAN IT BE REDUCED BY ACUPUNCTURE AND EXERCISE?

Elisabet Stener-Victorin, Manuel Maliqueo, Julia Johansson and Louise Mannerås Holm.

Institute of Neuroscience and Physiology, Department of Physiology, Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg, Sweden.

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a complex endocrine and metabolic disorder. The precise aetiology of the disease is unknown. A potential contribution of the sympathetic nervous system as a primary factor in the development and maintenance of PCOS has been suggested. For example, PCOS is associated with ovulatory dysfunction, hyperandrogenism, insulin resistance, abdominal obesity and cardiovascular disease, all factors hypothesized to be associated with increased activity of the sympathetic nervous system. Women with PCOS have greater density of ovarian catecholaminergic nerve fibers and increased ovarian sympathetic nerve activity which might contribute to PCOS by stimulating androgen secretion. This would explain why ovarian wedge resection or laparoscopic laser cauterization, which likely disrupt ovarian sympathetic innervation, increase ovulatory responses in women with PCOS. Further, we have shown that early increase of ovarian nerve growth factor (NGF) may constitute a major pathogenetic factor of estradiol valerate induced PCO rats. Women with PCOS have also been shown to have altered catecholamine metabolism, increased sympathetic and decreased parasympathetic components of heart rate variability, and abnormal heart rate recovery after exercise test. Recently, for the first time, direct intra-neural recordings of sympathetic nerve activity has been obtained in women with PCOS by our own group (1). We clearly demonstrated that PCOS is associated with increased sympathetic nerve activity and that the strongest independent factor was elevated testosterone concentrations characterizing PCOS. The augmented sympathetic outflow may contribute to increased prevalence of vascular disease reported in these individuals and may be involved in the etiology of the condition. Repeated acupuncture treatment in women with PCOS has been shown to exert long-lasting beneficial effects on endocrinological parameters and anovulation with no negative side effects (2, 3). Acupuncture with electrical stimulation has also been shown to decrease high ovarian NGF (4, 5), and adrenergic receptors (6) in the estradiol valerate (EV)-induced rat PCOS model, and to decrease high mRNA expression of NGF and several markers of sympathetic activity in adipose in the DHT-induced PCOS model (7). Together with microneurography measurements demonstrating a decrease of high muscle sympathetic nerve activity in women with PCOS after repeated acupuncture treatments, this indicates an involvement of the sympathetic nervous system in both PCOS etiology and the mechanistic effect of acupuncture (8).

Financial Support: The work was supported by the Swedish Medical Research Council, Hjalmar Svensson Foundation; Adlerbert Research Foundation; Swedish federal government under the LUA/ALF agreement ALFFGBG-136481

CONGRESO 2013: SIMPOSIO "AUTONOMIC CONTROL OF THE OVARY"

SYMPATHETIC STRESS DURING GESTATION IMPAIRS FOLLICULAR RECRUITMENT IN THE OVARY OF FEMALE OFFSPRING.

Lara, H.E.¹; Barra, R.¹; Cruz, G.¹; Mayerhofer, A.²; Paredes, A.¹

¹Laboratory of Neurobiochemistry, Faculty of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, Universidad de Chile, 8380492 Independencia, Santiago, Chile. ²LMU, Anatomy III - Cell Biology, 80802 Munich, Germany

Stress is particularly harmful when exposure occurs during gestation. In adult rats we found that chronic cold stress activates ovarian sympathetic innervation and develops polycystic ovary (PCO) condition. PCO syndrome is the most frequent ovarian pathology during reproductive years in women and most of the characteristic cases of PCOS originate during early development in human and are expressed either before or during puberty, suggesting a condition derived from *in utero* exposure to neural or metabolic derived insults. Now we want to discuss the effect of gestational sympathetic stress in the development of ovary function and in the onset of puberty. Timely pregnant rats were exposed to a 4° cold stress 3h/daily (from 10:00-13:00hrs) during all pregnancy. Ovary development of the female progeny was studied at 2 days old (neonatal) and at 30 days old (pre-pubertal). The age of puberty and steroids plasma levels were studied in another group of rats.

Neonatal rats exposed to sympathetic stress during gestation presented a lower number of ovarian primary follicles and a lower transition between primary to secondary follicles. The expression of FSH receptor and its response to FSH was decreased. The response to FSH-induced secondary follicles development was decreased. Estradiol plasma level before puberty was decreased and the puberty onset (as seen by vaginal opening) was delayed. The amount of ovarian norepinephrine was significantly reduced in stressed rats. Thus we conclude that gestational stress not only decreases the early follicular development of the progeny but also the responsiveness to gonadotropins and thus delaying puberty. On the other hand the fact that ovarian NE was decreased could mean that increased NE levels during gestation might induce a compensatory response in the progeny by decreasing the development of sympathetic nerves of the ovary.

Financial Support: Supported by Fondecyt 1130049 and DFG10-PIA-Conicyt grant

CONGRESO 2013: SIMPOSIO "PROGRAMA DE DOCTORADO EN FARMACOLOGÍA"

CAMBIOS EN LOS RECEPTORES β -ADRENÉRGICOS CARDÍACOS EN LA PROGENIE DE MADRES EXPUESTAS A ESTRÉS DURANTE LA GESTACIÓN (Changes in β -adrenergic cardiac receptors in the progeny of mothers exposed to stress during gestation).

Piquer. B¹, Bahamondes.G¹, Barra.R¹, Díaz.G² y Lara.H.E¹

¹Laboratorio de Neurobioquímica, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. ²Laboratorio de Farmacoquímica, Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

La activación del Sistema Nervioso Simpático inducido por estrés aumenta la noradrenalina (NA), obteniendo una respuesta simpaticomimética conocida como "respuesta de pelea o huida". Existen etapas del desarrollo particularmente sensibles al estrés. Por ejemplo, un estrés crónico que modifique el ambiente fetal, tiene efectos que programan permanentemente el desarrollo postnatal. En este trabajo estudiamos el efecto que produce el estrés prenatal por frío sobre la función cardiovascular de la descendencia. Ratas Sprague-Dawley preñadas fueron expuestas a estrés por frío (4°C/3h/día) durante todo el período de gestación y se evaluó el efecto en la descendencia. Se usó los corazones de la progenie adulta (machos y hembras) para estudiar los receptores β -adrenérgicos (radioligando) y la actividad de los nervios simpáticos cardíacos (NA, MHPG por HPLC). También se evaluó en las crías machos adultas, el efecto de la estimulación β -adrenérgica mediante isoproterenol (agonista β -adrenérgico) (1mg/kg peso/día/10 días). Observamos diferencias entre los géneros, las hembras de madres estresadas pesaron menos pero tuvieron mayor peso ventricular que las controles. En machos existió una menor concentración de receptores β -adrenérgicos cardíacos y una mayor actividad nerviosa simpática comparados con las hembras. El estrés por frío no modificó la concentración de receptores β -adrenérgicos cardíacos, ni la noradrenalina ni la actividad nerviosa. Sin embargo, ocurrió una disminución en la afinidad de los receptores β -adrenérgicos y estos animales fueron más sensibles a la estimulación β -adrenérgica con isoproterenol *in vivo* presentando una elevada tasa de mortalidad a dosis que no afectan a los controles. Por lo tanto, la exposición de madres gestantes a estrés simpático durante la gestación, cambia la respuesta funcional de los receptores β -adrenérgicos cardíacos, que se traduce en una mayor sensibilidad de la progenie a estimulación adrenérgica durante la etapa adulta. Las diferencias entre machos y hembras, indicaría distinta susceptibilidad a la respuesta frente al estrés.

Agradecimientos: Proyecto FONDECYT 1130049

RECEPTORES β -ADRENÉRGICOS EN FIBROBLASTOS CARDÍACOS: AUTOFAGIA Y FIBROSIS (β -adrenergic receptors in cardiac fibroblasts: autophagy and fibrosis)

Olmedo I.¹, Aránguiz P.¹, Muñoz C.¹, Catalán M.¹, Vivar R.¹, Ayala P.¹, Díaz Araya G.¹

¹Laboratorio Farmacoquímica, Departamento de Química Toxicológica y Farmacológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

El remodelado cardíaco (RM) es común a varias patologías cardíacas, y se caracteriza por un excesivo depósito de proteínas de la matriz extracelular (MEC) que conduce a fibrosis cardíaca. El fibroblasto cardíaco (FC) juega un rol fundamental en el RM puesto que regula la síntesis y la degradación de la MEC. Los FC expresan receptores β -adrenérgicos los cuales son los principales blancos de la sobre estimulación adrenérgica característica durante los procesos de RM y fibrosis. La activación de estos receptores conduce a un aumento en los niveles de AMPc activando río abajo las vías de señalización EPAC y/o PKA, y por lo tanto regulan importantes procesos celulares como la autofagia y fibrosis, las que conducen al RM patológico. Los estudios realizados en nuestro laboratorio utilizaron fibroblastos de rata adulta y neonata. Se simuló la sobrecarga adrenérgica *in vitro*, y se evaluó la presencia de marcadores autofágicos tales como la formación de vacuolas autofágicas por microscopía electrónica y redistribución/procesamiento de la proteína LC3 mediante inmunofluorescencia e inmunowesternblot (IWB). Paralelamente se estudió la participación de EPAC en procesos asociados al remodelamiento cardíaco tales como adhesión, migración, contracción de geles de colágeno y expresión de colágeno. Los resultados obtenidos demostraron que las catecolaminas inducen autofagia en fibroblastos cardíacos de rata adulta principalmente mediante la activación de AMPK. Así mismo, el aumento de la autofagia se correlacionó con el aumento en la degradación de colágeno tipo I. Por otro lado, EPAC estaría aumentando la adhesión de fibroblastos a fibronectina, promoviendo la migración de fibroblastos, aumentando la contracción de geles de colágeno y disminuyendo los niveles de colágeno.

Conclusión: La estimulación β -adrenérgica gatilla la autofagia en fibroblastos cardíacos y la degradación de colágeno. EPAC aumenta la adhesión, migración y contracción de geles de colágeno, mientras que disminuye la expresión de colágeno.

Agradecimientos: Proyecto FONDECYT 1100443, Beca Doctorado Nacional CONICYT y Beca de Apoyo a la realización de Tesis Doctoral CONICYT N° AT-24110021.

CONGRESO 2013: SIMPOSIO "PROGRAMA DE DOCTORADO EN FARMACOLOGÍA"

ACCIÓN DEL BLOQUEO β -ADRENÉRGICOS EN EL ENVEJECIMIENTO OVÁRICO Y LA MEJORA DE LA FUNCIÓN REPRODUCTIVA.

Fernandois D. Lara HE, Paredes AH

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

En la actualidad, las mujeres han retrasado la maternidad hasta después de los 30 años. A partir de esta edad, comienzan los problemas de fertilidad y disminuye el porcentaje de éxito de los programas de fertilidad *in vitro*. Por tanto, es importante conocer los mecanismos implicados en el envejecimiento de ovario durante este período. Usando ratas como modelo experimental, se ha descrito que el sistema nervioso simpático (SNS) es uno de los principales componentes que regulan la función ovárica. Durante el envejecimiento reproductivo, los ovarios de ratas desarrollan espontáneamente quistes foliculares con un aumento concomitante de la actividad nerviosa, lo que estaría involucrada en el cese de la función ovárica. Los receptores adrenérgicos presentes en el ovario son en su mayoría de los receptores β_2 -adrenérgicos y la noradrenalina ejerce su efecto a través de ellos. Por tanto el bloqueo de la actividad del SNS en el ovario podría reactivar el desarrollo folicular y disminuir el número de quistes foliculares. El propósito de este trabajo es bloquear el efecto del SNS a través de la administración *in vivo* de propranolol para generar un retraso en la formación de quistes y mejora de los parámetros de fertilidad. Por esta razón, fue administrado propranolol (5 mg/kg de peso) diariamente a ratas Sprague-Dawley de 8 y 10 meses de edad durante 2 meses. Se determinó la ciclicidad estral, la concentración sérica de hormonas esteroidales, contenido de NA y MHPG (recambio nervioso) y el análisis morfológico del ovario. Los resultados muestran aumento en: cantidad de folículos sanos, la tasa de ovulación, esteroides séricos y recambio nervioso. Por otro lado muestran una disminución en los quistes foliculares. Estos resultados, sugieren que el bloqueo β -adrenérgicos recupera parcialmente la función ovárica durante el envejecimiento reproductiva. Sugiriendo una expansión de la ventana de la subfertilidad.

Agradecimientos: Proyecto Fondecyt 1090159

ESTIMULACIÓN ADRENÉRGICA POR ISOPROTERENOL INDUCE EL DESARROLLO Y MANTENCIÓN DE OVARIO POLIQUÍSTICO EN RATA (Adrenergic stimulation by Isoproterenol induces polycystic ovary development in rat).

Luna S.L.¹, Lara H.E.²

¹Depto. Bioquímica, Facultad de Farmacia, Universidad de Valparaíso. ²Laboratorio de Neurobioquímica, Depto. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Es ampliamente aceptado que la actividad nerviosa simpática controla dos procesos que ocurren en el ovario: el desarrollo folicular y la secreción de hormonas esteroidales. La respuesta del ovario a las catecolaminas reside en la presencia de receptores β_2 adrenérgicos. Evidencia reunida en modelos animales y en humanos sugieren que un aumento crónico de la actividad nerviosa simpática participa en el desarrollo de poliquistosis e hiperandrogenismo, rasgos característicos de Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP), la patología más prevalente de la mujer en edad reproductiva. Se abordó esta hipótesis remediando un tono adrenérgico aumentado al estimular "in vivo" los receptores β -adrenérgicos mediante la administración del agonista Isoproterenol (ISO). Para corroborar la relación causal, se bloqueó el efecto del agonista mediante la administración conjunta del antagonista propranolol (PROP). Ratas hembras adultas recibieron ISO (125 μ g/kg durante 10 días), un tratamiento usado para inducir hipertrofia cardíaca, o ISO+PROP (5mg/kg/día), se sacrificaron en estro al finalizar el tratamiento o 30 días después, tomando en consideración el tiempo requerido para completar el desarrollo de una cohorte folicular. ISO, mientras estuvo presente, además de producir hipertrofia cardíaca, indujo el desarrollo de quistes foliculares y aumentó la secreción "in vitro" de andrógenos. El bloqueo con propranolol previno la hipertrofia cardíaca, revirtió el efecto sobre la actividad secretora de andrógenos y el desarrollo de quistes foliculares. La alteración en el desarrollo folicular inducido por el agonista no afectó la ciclicidad estral, ni capacidad ovulatoria ya que los niveles circulantes de progesterona y el número de ovocitos recolectados de oviducto fueron similares a los controles.

El presente trabajo corrobora que la estimulación β -adrenérgica es un componente del desarrollo y mantención de la condición de ovario poliquístico, abriendo la posibilidad de un manejo farmacológico de SOP.

Agradecimientos: Proyecto FONDECYT 1090036 (H.E.L.) y Beca CONICYT-AT 24080037 (S.L.L.).

Correo electrónico: leticia.luna@uv.cl

CONGRESO 2013: SIMPOSIO "TGF- β 1 Y REGULACIÓN DE LA FIBROSIS"

FIBROSIS ASSOCIATED WITH CHRONIC DISEASES: TGF- β AND ITS CONTRIBUTION TO FUNCTIONAL IMPAIRMENT.

Brandan, E.

CARE and Faculty of Biological Sciences, Catholic University of Chile, Santiago, Chile. ebrandan@bio.puc.cl

Muscular dystrophies are characterized by a decrease of muscle mass, reduced muscle force and an increase in fibrosis. Transforming growth factor type beta (TGF β) is overexpressed in several skeletal muscular dystrophies.

Renin angiotensin system (RAS) and connective tissue growth factor (CTGF) are also overexpressed in muscular dystrophies and correlate with the degree and severity of fibrosis in Duchenne Muscular Dystrophy (DMD).

Using different animal's model for DMD we have evaluated the role of CTGF and the RAS system on the progression of fibrosis with emphasis in the TGF β signaling pathways.

Results will be discussed on the factors involved in the progression of fibrosis and the potential use of inhibitors to improve skeletal muscle function in these pathologies.

Financial Support: Supported by CARE PFB 12/2007, Fondecyt 1110426.

ROL DEL TGF- β 1 Y FOXO1 EN LA RESISTENCIA ANTIOXIDANTE DE MIOFIBROBLASTOS CARDIACOS COMO POSIBLE MECANISMO PROFIBRÓTICO (Role of TGF- β 1 and FoxO1 in cardiac myofibroblasts antioxidant resistance as a possible profibrotic mechanism)

Vivar Sánchez, R.

Laboratorio de Farmacología Molecular Cardiovascular, Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

La fibrosis cardiaca se caracteriza por la rigidización del músculo cardiaco, como consecuencia de un elevado depósito de proteínas de matriz extracelular por los fibroblastos cardiacos (FC). En presencia de daño tisular los FC se diferencian a una célula mucho más activa, el miofibroblasto cardiaco (MFC), principalmente por TGF- β 1. Los MFC son células especializadas en la reparación tisular y son claves en el desarrollo de la fibrosis cardiaca. Los MFC son resistentes a la muerte celular y por lo tanto, no desaparecen de la zona dañada posterior a la cicatrización; sin embargo, los mecanismos continúan siendo desconocidos. Por lo tanto, es relevante la investigación referente a dicho fenómeno, y a nivel celular, nuestro laboratorio ha dado luces de algunos probables mecanismos.

Los FC tratados con TGF- β 1 (MFC) son más resistentes a estímulos oxidantes y apoptóticos. Respecto a esto, angiotensina II induce apoptosis de FC, a través de estrés oxidativo, efecto prevenido por TGF- β 1. Igualmente, TGF- β 1 ha mostrado ser protector en FC expuestos a estímulos oxidativos, p.e. en la isquemia/reperfusión. Es importante señalar que el MFC fue más resistente a la muerte que el FC. A nivel molecular ha habido grandes avances respecto a los mecanismos de diferenciación FC-MFC, mientras que hay escasas evidencias acerca de la mayor resistencia oxidante de este último. En nuestro laboratorio, nos hemos enfocado en el factor de transcripción anti-oxidante FoxO1 y la relación con TGF- β 1, como posible vía de señalización pro-sobrevivencia en MFC. FC tratados con TGF- β 1 (MFC) demuestran mayor nivel y actividad transcripcional de FoxO1 sumado a mayores niveles de la proteína antioxidante MnSOD, lo cual se tradujo en mayor resistencia al estrés oxidativo. Resultará importante demostrar a FoxO1 como clave en la señalización del TGF- β 1 que le otorga la mayor resistencia anti-oxidante/anti-apoptótica a MFC, esperanzados en la búsqueda de nuevos blancos farmacológicos anti-fibróticos.

Agradecimientos: Proyecto Postdoctoral #3130657.

Correo electrónico: raul.vivar.s@gmail.com

CONGRESO 2013: SIMPOSIO “TGF- β 1 Y REGULACIÓN DE LA FIBROSIS”

TGF- β 1 INDUCE FIBROSIS CARDIACA: PARTICIPACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN FIBROBLASTO A MIOFIBROBLASTO CARDIACO

(TGF- β 1 induces cardiac fibrosis: participation of cardiac fibroblast to myofibroblast differentiation)

Díaz-Araya, G.

Laboratorio de Farmacología Molecular Cardiovascular, Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

TGF- β 1 es una citoquina que regula varios procesos celulares (proliferación, apoptosis, diferenciación, migración, síntesis de proteínas de matriz extracelular y diferenciación celular); sin embargo, a nivel cardíaco destacan sus efectos cardioprotectores y antiapoptóticos. Esta citoquina induce la diferenciación del fibroblasto cardíaco a un fenotipo mucho más activo, el miofibroblasto cardíaco, siendo este último tipo celular el responsable inicial de la cicatrización tisular. Sin embargo, paralelo a la diferenciación celular esta citoquina cambia la expresión de diversas proteínas las que otorgan al miofibroblasto características muy particulares. Entre ellas, aumenta la expresión de la proteína Rho, la que favorece una mayor adhesión, y aumenta la propiedad contráctil del miofibroblasto, y consecuentemente el remodelamiento de la matriz extracelular. Al mismo tiempo, induce un aumento en la expresión de los receptores de tipo toll-4 y B1 de cininas; así como también, sintetiza y secreta mayores cantidades de IL-1 β , TNF- α y TGF- β 1, 2 y 3; y finalmente, los miofibroblastos tienen mayores niveles de expresión de las proteínas de adhesión VCAM e ICAM. Todas esas características en su conjunto otorgan al miofibroblasto una mayor participación en la respuesta inflamatoria, cuya cronicidad puede conducir al desarrollo de fibrosis cardíaca.

Por otro lado, la diferenciación de fibroblasto a miofibroblasto va acompañada de mayor resistencia a la apoptosis, inducida ya sea por mecanismos de hipoxia/reoxigenación, por radicales libres de oxígeno, por Ang II en condiciones de sobre expresión del receptor AT1 de Ang II, o por simvastatina. Además, el miofibroblasto presenta un mayor nivel de autofagia, sin gatillar mecanismos de muerte celular. En este sentido, los miofibroblastos tienen mayores niveles de expresión de las proteínas antiapoptótica Bcl2 y reducidos niveles de la proapoptótica bax, cuyo desbalance puede también conducir al desarrollo de fibrosis cardíaca.

Agradecimientos: Fondecyt 1100443.

Correo electrónico: gadiaz@ciq.uchile.cl

CONGRESO 2013: SIMPOSIO "NEUROFARMACOLOGÍA DEL ESTRÉS"

MICROBIOTA INTESTINAL Y ESTRÉS (Intestinal microbiota and stress)

Bravo J.A.¹

¹Grupo de NeuroGastroBioquímica, Laboratorio de Química Biológica, Instituto de Química, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

La evidencia científica actual muestra la existencia de una comunicación bidireccional entre la microbiota intestinal y el sistema nervioso central. Esto ha permitido postular lo que hoy en día se reconoce como el eje microbiota-intestino-cerebro. Por ejemplo, en ratones axénicos la ausencia de microbiota intestinal desde el nacimiento afecta la conducta y las respuestas fisiológicas al estrés en la adultez. También, el estrés psicosocial durante etapas tempranas de la vida en ratas altera la neuroquímica del cerebro, el comportamiento, la función barrera intestinal y la composición de la microbiota intestinal. Es así que intervenciones a nivel de la microbiota intestinal aparecen como una novedosa estrategia terapéutica para el tratamiento de trastornos mentales relacionados al estrés, tales como depresión y ansiedad.

Un ejemplo de intervención de la microbiota con un fin terapéutico es el uso de probióticos. Los probióticos son bacterias vivas que al ser consumidas en cantidades adecuadas promueven un beneficio al hospedero. Se ha demostrado que el *Lactobacillus rhamnosus* JB-1 disminuye las conductas similares a ansiedad y depresión en ratones sanos, y además reduce los niveles de corticosterona inducidos por estrés. Por otro lado, *Lactobacillus rhamnosus* JB-1 induce cambios en la expresión del mRNA de los receptores GABA_{A1}, GABA_{A2} y GABA_{B1b} en corteza prefrontal, amígdala e hipocampo. Es interesante destacar que estos cambios en comportamiento y fisiológicos no se observaron en ratones vagotomizados, resultado que sugiere que esta comunicación entre microbiota y sistema nervioso central es dependiente del nervio vago. En conjunto estos resultados demuestran la importancia de las bacterias intestinales en la comunicación entre el intestino y el cerebro, y además sugiere que ciertos organismos podrían ser útiles como terapia adjunta para el tratamiento de desórdenes psiquiátricos tales como ansiedad y depresión.

Agradecimientos: PUCV DI 037.499/2013, PUCV DI 037.302/2013 y Fondecyt 1130213

Correo electrónico: javier.bravo@ucv.cl

Patrocinante: Sotomayor-Zárate, R.

EFFECTOS ANTIESTRÉS Y ANSIOLÍTICO DE LOS ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 (Anti-stress and ansiolytic effects of omega-3 fatty acids).

Dagnino-Subiabre, A.; Pérez, M.A.

Laboratorio de Neurobiología y Conducta, Centro de Neurobiología y Plasticidad Cerebral, Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile.

El estrés crónico estimula la secreción de la hormona corticosterona, induciendo atrofia dendrítica hipocámpal e hipertrofia en el complejo amigdalóide de rata. Estas alteraciones neuro-morfológicas están asociadas a un deterioro de la memoria y a un aumento de la ansiedad. Contrariamente, la suplementación con ácidos grasos omega-3 mejora el aprendizaje y la memoria en ratas controles. El objetivo de esta investigación fue evaluar, en ratas estresadas, los efectos de la suplementación con omega-3 sobre el aprendizaje, memoria y los principales marcadores biológicos y conductuales del estrés. Ratas machos *Sprague-Dawley* fueron divididas en 3 grupos experimentales: 1) Control, 2) Vehículo y 3) Omega-3 (mezcla de 100 mg de DHA + 25 mg de EPA/kg/día, vía oral). Cada grupo de animales fue dividido en 2 subgrupos, uno Control, que no fue sometido a ningún estresor experimental, y otro Estrés, que fue sometido a un protocolo de estrés por restricción de movimientos. Después, el aprendizaje y la memoria fueron analizados con los paradigmas conductuales fear conditioning y laberinto en Y, respectivamente. Los marcadores de estrés analizados fueron la concentración plasmática de corticosterona a través de ELISA y la ansiedad medida con el laberinto en cruz elevado. El estrés crónico deterioró el aprendizaje y la memoria, mientras que los niveles de corticosterona aumentaron al igual que número de entradas al brazo abierto del laberinto en cruz elevado. Además, encontramos que el estrés crónico disminuyó la transmisión sináptica GABAérgica en el hipocampo. Todas estas alteraciones fueron mejoradas en las ratas estresadas que fueron suplementadas con omega-3. Nuestros resultados demuestran que la suplementación con omega-3 tiene dos efectos beneficiosos en las ratas estresadas, tiene un potente efecto antiestrés y mejora la memoria.

Agradecimientos: Financiado por Proyecto FONDECYT N° 1100413.

Correo electrónico: alexies.dagnino@uv.cl ; www.stress.cl

Patrocinante: Sotomayor-Zárate, R.

CONGRESO 2013: SIMPOSIO "NEUROFARMACOLOGÍA DEL ESTRÉS"

INVESTIGANDO OTRAS RESPUESTAS AL ESTRÉS: EFECTOS SOBRE MOTILIDAD, SECRECIÓN Y PERMEABILIDAD INTESTINAL (Looking at other stress responses: intestinal secretion, motility and permeability)

Julio-Pieper, M.¹

¹ Grupo de NeuroGastroBioquímica, Laboratorio de Química Biológica, Instituto de Química, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile

El malestar gastrointestinal se identifica como un síntoma clásico ante una condición de estrés agudo o crónico. En la clínica, una alta proporción de pacientes que consultan a su médico por ansiedad, depresión o trastornos de pánico, reportan también problemas como diarrea, constipación, hinchazón o dolor abdominal. En la situación opuesta, pacientes que buscan asistencia médica por trastornos gastrointestinales presentan síntomas similares a la ansiedad o depresión con mayor frecuencia que aquellos pacientes sin síntomas gastrointestinales.

Si consideramos que los trastornos mencionados pueden deberse a una alteración en el "eje cerebro-intestino", existe el desafío de desarrollar nuevas estrategias farmacológicas con acción múltiple, que puedan atacar de manera simultánea, los distintos componentes de estas patologías. En esta presentación se abordarán dos elementos que apuntan a lo anterior: la detección de nuevos blancos farmacológicos en el intestino, y el uso de estrategias experimentales que permitan pesquisar los efectos centrales así como gastrointestinales de un fármaco en estudio.

Mediante el uso de modelos que generan estrés en el ratón de manera aguda (campo abierto) o de manera repetitiva (restricción de movimiento), se han evaluado cambios en la función intestinal, los que han sido asociados a la participación de los sistemas glutamatérgico y serotoninérgico intestinales. Estos resultados no solo representan un avance en aspectos mecanísticos de la respuesta intestinal inducida por estrés, sino que además corresponden a una primera aproximación en el descubrimiento de estrategias farmacológicas novedosas para patologías que afectan el eje cerebro-intestino.

Agradecimientos: PUCV DI 037.302/2013, Fondecyt 1130213 y Conicyt 79112017

Correo electrónico: marcela.julio@ucv.cl

Patrocinante: Sotomayor-Zárate, R.

ESTRÉS REPETIDO POR INMOVILIZACIÓN EVITA LA LIBERACIÓN DE DOPAMINA INDUCIDA POR COCAÍNA EN EL ÁREA TEGMENTAL VENTRAL DE RATA (Repeated immobilization stress avoids cocaine-induced dopamine and glutamate release in the rat ventral tegmental area).

Sotomayor-Zárate, R.^{1,2}; Araya, K.A.¹; Renard, G.M.^{1,2}; Abarca, J.¹; Gysling, K.¹

¹Núcleo Milenio de Estrés y Adicción (NEDA), Pontificia Universidad Católica de Chile. ²Centro de Neurobiología y Plasticidad Cerebral, Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso.

Las experiencias estresantes como conflictos interpersonales, exposición a temperaturas extremas, ayuno prolongado y abstinencia a drogas de abuso, generan estados adaptativos que cambian la homeostasis corporal a través de la activación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal. Esta activación produce un aumento del factor liberador de corticotropina (CRF) en la Hipófisis y en otras áreas extrahipotalámicas, que pueden llevar incluso a la activación del Sistema Nervioso Autónomo. En este sentido el estrés repetido por inmovilización (ERI) ha demostrado producir conductas ansiosas en ratas, cambios en la recaptación de noradrenalina y un aumento de la inmunoreactividad para CRF en Amígdala e Hipotálamo.

En este trabajo hemos estudiado los efectos neuroquímicos de ERI sobre los niveles extracelulares de dopamina (DA) en el área tegmental ventral (VTA) de ratas machos adultas. Los niveles extracelulares de DA fueron medidos en muestras de dializado cerebral a través de HPLC acoplado a detección electroquímica. Para determinar el posible rol del sistema CRFérgico en los efectos producidos por ERI, se decidió estudiar los efectos de la perfusión por microdialisis reversa de CRF y CP-154526, un antagonista selectivo del CRF-R₁ en VTA de ratas control y expuestas a ERI. Por otro lado, niveles extracelulares de CRF fueron medidos en ratas estresadas radioinmunoensayo. Nuestros resultados demostraron que la administración aguda de cocaína (10 mg/Kg i.p.) produce un aumento de los niveles extracelulares de DA en ratas control, sin embargo en ratas estresadas este efecto no se produce. El ERI produce un incremento de los niveles extracelulares de CRF y la perfusión de CRF (20 µM) en VTA de ratas control evita la liberación de DA inducida por cocaína. Interesantemente, la perfusión de CP-154526 (10 µM) incrementa la liberación de DA inducida por cocaína en ratas estresadas.

Nuestros resultados sugieren que el ERI incrementa los niveles extracelulares de CRF en VTA, los cuales a través de la activación del CRF-R₁ inhibe la liberación de DA inducida por cocaína.

Agradecimientos: Financiado por ICM N° P10/063-F y Proyecto FONDECYT N° 111-0392.

Correo electrónico: ramon.sotomayor@uv.cl

CONGRESO 2013: SIMPOSIO “PROPIEDAD INTELECTUAL”

INVESTIGACIÓN, DESARROLLO Y COMERCIALIZACIÓN DE MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS DESDE CHILE AL MUNDO: EL CASO DE ANDES BIOTECHNOLOGIES.

Hernández-Cuevas, C.¹

Andes Biotechnologies, Santiago, Chile

Andes Biotechnologies es una compañía biotecnológica Chilena que está desarrollando una nueva terapia contra el cáncer que puede llegar a convertirse en una de los primeros tratamientos no tóxicos y de amplio espectro (efectivo contra varios tipos de cáncer) descritos en el mundo. Con casi 15 años de investigación a cuesta, esta empresa, fundada por los Drs. Luis Burzio, Pablo Valenzuela y Arturo Yudelevich ha tenido que sortear innumerables desafíos. La presentación cubrirá a) Aspectos generales de cómo opera la industria biofarmacéutica, b) una descripción didáctica de la tecnología (droga) en desarrollo en la Compañía, c) una descripción (en una línea de tiempo) de los procesos y obstáculos que ha tenido que superar la empresa para llegar a donde está hoy (esto incluye aspectos de investigación, propiedad intelectual, regulatorios, financieros y de comercialización) y d) un resumen de las lecciones aprendidas para quienes quieran seguir el camino del bio-emprendimiento en Chile.

ACCESO Y PROMOCIÓN DE LA INNOVACIÓN; COMO LOGRAR UN BALANCE PARA LA REALIDAD CHILENA

Etcheverry, A.¹

Instituto Nacional de Propiedad Intelectual, Ministerio de Economía, Santiago, Chile

Una adecuada protección de la salud requiere, entre otros, de más medicamentos disponibles a un menor precio y del desarrollo de nuevas drogas que permitan mejorar la calidad de vida y curar de nuevas enfermedades. Tradicionalmente la promoción de la innovación en materia farmacéutica se ha asociado a una mayor protección a través de los derechos de propiedad intelectual. El acceso, por su parte, se ha vinculado a la presencia de medicamentos genéricos en el mercado. Esta dualidad se ve reflejada en los tratados internacionales de que Chile es parte, en las constantes discusiones públicas en materia de propiedad intelectual y Salud, y ha sido esencial en el desarrollo de las normas sobre propiedad intelectual. En este contexto, y considerando el desarrollo de la materia en los últimos años, cabe analizar cómo estos parámetros tradicionales juegan en realidad nacional y cuáles son las mejores políticas para lograr efectivamente una adecuada protección de la salud. Para ello, es imprescindible el análisis de qué herramientas se encuentran disponibles para mejorar acceso e innovación, en qué medida los acuerdos internacionales y tratados de libre comercio afectan la posibilidad que tiene Chile de utilizar estas herramientas y cuál es el espacio regulatorio aún disponible para el desarrollo de políticas públicas en estas materias.

CONGRESO 2013: SIMPOSIO “PROPIEDAD INTELECTUAL”

INNOVACIÓN FARMACÉUTICA Y PROPIEDAD INTELECTUAL: ¿EQUILIBRIO ENTRE INNOVACIÓN Y ACCESO?

López-Muñoz, R.^{1,2}

¹Programa de farmacología Molecular y Clínica, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile. ²ONG “Políticas Farmacéuticas”, Santiago, Chile.

La innovación farmacéutica comprende uno de los pilares fundamentales del progreso médico, siendo en muchos casos piedras angulares del aumento de la expectativa de vida de la humanidad. Desde 1995, la innovación farmacéutica a nivel mundial se sienta sobre los pilares de la propiedad intelectual, como estrategia para hacer sustentable el gasto que implica el desarrollo de un nuevo fármaco. No obstante un modelo aparentemente exitoso, la decreciente cantidad de nuevas entidades químicas en el mercado y el aumento de los costos en I+D hacen que la eficiencia de la industria farmacéutica se vuelva cada vez menor. En ese sentido, la propiedad intelectual ha jugado un doble papel, ya que por un lado favorece el proceso innovativo y por otro disminuye el acceso por parte de la población a las nuevas innovaciones. Procedimientos como el evergreening y la protección de datos de prueba no hacen pensar si el exceso de protección a la propiedad intelectual realmente está cumpliendo su objetivo: aumentar la disponibilidad de nuevas y mejores terapias para la población.

CONGRESO 2013: INCORPORACIONES

CANALES IONICOS HCN: EVIDENCIA IN VIVO DE UN POSIBLE NUEVO BLANCO FARMACOLOGICO DEL ETANOL (HCN ionic channels: in vivo evidence of a possible new pharmacological target of ethanol).

Rivera-Meza, M.¹; Quintanilla M.E.¹; Bustamante, D.¹; Delgado, R.³; Buscaglia, M.¹; Herrera-Marschitz, M.^{1,2}.

¹ Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina; ² Iniciativa Científica Milenio BNI-Chile; ³ Departamento de Biología, Facultad de Ciencias; Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Diversos estudios han demostrado que el etanol es capaz de activar en el cerebro circuitos dopaminérgicos y que puede ser autoadministrado intracerebralmente por ratas en el área tegmental ventral (VTA). Por otro lado, estudios *in vitro* e *in silico* han mostrado que los canales iónicos del tipo HCN (Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated) presentes en las neuronas dopaminérgicas del VTA pueden constituir un blanco molecular del etanol; sin embargo no existe evidencia *in vivo* que apoye esta hipótesis. Ratas Wistar de la línea UChB (Universidad de Chile Bebedoras) fueron microinyectadas en el VTA con un vector lentiviral codificante del canal HCN-2 o con un vector control. Cuatro días después, los animales fueron expuestos a un paradigma de libre acceso entre una solución de etanol al 5% y agua, y el consumo diario de alcohol registrado durante 30 días continuos. Los efectos de la sobreexpresión del canal HCN-2 sobre las propiedades reforzantes y estimulantes del alcohol fueron evaluados mediante estudios de: (i) preferencia condicionada de lugar; (ii) actividad locomotora, y (iii) liberación de dopamina en el núcleo accumbens. Las ratas tratadas en el VTA con el vector codificante de HCN-2 mostraron un aumento de 2 veces en su consumo voluntario de etanol en relación al grupo control. Además, los animales tratados con el lentivirus HCN-2 mostraron un aumento en la preferencia de lugar condicionada por etanol, una mayor actividad locomotora inducida por etanol y un aumento en la liberación de dopamina en el núcleo accumbens luego de la administración de una dosis de etanol.

Estos resultados sugieren que los niveles de canales iónicos HCN en el VTA de ratas son relevantes para las propiedades reforzantes y estimulantes del etanol. Asimismo, los canales HCN pueden constituir un nuevo blanco farmacológico del etanol con posibilidades terapéuticas.

Agradecimientos: FONDECYT 3110107, 1120079, 1130012; BNI Instituto Milenio P09-015-F.

Correo electrónico: mariorivera@med.uchile.cl

Socio Patrocinante: Quintanilla, M.E.

OBESIDAD DURANTE LA GESTACIÓN Y ALTERACIONES REPRODUCTIVAS DE LA DESCENDENCIA (Gestational Obesity and reproductive alterations on the offspring).

Ambrosetti, A.¹; Guerra, M.¹; Ramírez, L.¹; Reyes, A.¹; Sotomayor-Zárate, R.^{1,2}; **Cruz, G.**¹

¹ Centro de Neurobiología y Plasticidad Cerebral (CNPC), Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso. ² Núcleo Milenio en Estrés y Adicción, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile.

En Chile más del 50% de las mujeres embarazadas tienen sobrepeso u obesidad. La obesidad durante el embarazo se ha relacionado con problemas durante el embarazo y el parto. A largo plazo, se ha observado que la descendencia de madres con obesidad gestacional presenta un aumento del riesgo de desarrollar síndrome metabólico y enfermedades reproductivas. Mujeres hijas de madres obesas tienen una pubertad precoz y es de nuestro interés reproducir este hallazgo en un modelo murino y observar si se acompaña de alteraciones en la función ovárica. Nuestra hipótesis es que una pubertad precoz y alteraciones reproductivas se producen en la descendencia debido a un incremento de estradiol en madres con obesidad gestacional. Como primera aproximación, utilizamos ratas Sprague Dawley que separamos en un grupo control con alimento normal (CD) y un grupo con una dieta alta en grasa (HFD, 60%Kcal en grasa). Después de un mes de tratamiento se realizó la cruce con machos controles manteniéndose la dieta durante la preñez y lactancia. Se estudió el peso, ingesta de alimentos y apertura vaginal (Como índice de pubertad) en la descendencia. Ambos grupos siguieron con CD después del destete. Encontramos que ratas hijas de madres obesas tuvieron un mayor peso al nacimiento y una mayor ganancia de peso hasta el destete comparadas con hijas de controles. Interesantemente a pesar de seguir con una dieta control después del destete, las hijas de madres obesas presentan una ganancia de peso mayor que las hijas de controles, lo que se relaciona con un aumento en la ingesta de alimento. Además, hijas de madres obesas presentaron una pubertad precoz reproduciéndose lo observado en humanos. Pretendemos evaluar además el desarrollo folicular y ciclicidad estral para confirmar nuestra hipótesis y observar si la administración de metformina logra prevenir dichas alteraciones.

Agradecimientos: Financiado por Centro de Neurobiología y Plasticidad Cerebral (CNPC), Universidad de Valparaíso.

Correo electrónico: gonzalo.cruz@uv.cl

Socio Patrocinante: Sotomayor-Zárate, R

PÉRDIDA A LARGO PLAZO DE LA LIBERACIÓN DE DOPAMINA MEDIADA POR EL RECEPTOR CRH-R1 EN EL SEPTUM LATERAL DE RATA LUEGO DE LA ADMINISTRACIÓN REPETIDA DE COCAÍNA (Long-term loss of dopamine release mediated by CRF-1 receptors in the rat lateral septum after repeated cocaine administration).

Renard, G.M.^{1,2}; Sotomayor-Zárate, R.^{1,2}; Araya, K.A.¹; Carreño, P.¹; Fuentealba, J.A.^{1,3}; Andrés, M.E.¹; Gysling, K.¹

¹Núcleo Milenio en Estrés y Adicción, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile. ²Centro de Neurobiología y Plasticidad Cerebral, Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso, Chile. ³Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile.

El septum lateral es un núcleo cerebral asociado al estrés y a la adicción a drogas de abuso. En este trabajo nosotros demostramos que los niveles extracelulares de dopamina en el septum lateral están bajo el control del factor liberador de corticotrofina (CRF). La diálisis reversa de estresina-1 1uM (un agonista selectivo del receptor CRF-R1) induce un significativo incremento de los niveles extracelulares de dopamina en el septum lateral de ratas control, el cual fue bloqueado por la co-perfusión de estresina-1 con CP-154526 (un antagonista selectivo del receptor CRF-R1). La administración repetida de cocaína (15 mg/kg, dos veces por día por 14 días) suprime el aumento en los niveles extracelulares de dopamina inducidos por la activación del CRF-R1. Esta supresión del efecto fue observada a las 24 hrs y a los 21 días de haber finalizado el tratamiento crónico con cocaína. Además, la liberación de dopamina inducida por un estímulo depolarizante (K^+ 110mM) induce una mayor liberación de dopamina en ratas tratadas con cocaína que en ratas control. Los resultados de este trabajo, demuestran que la activación del receptor CRF-R1 en el septum lateral induce una significativa liberación de dopamina. Interesantemente, la administración repetida de cocaína induce una supresión a largo plazo de la liberación de dopamina inducida por estresina-1 y un transitorio aumento de la liberabilidad de dopamina en el septum lateral.

Agradecimientos: Financiado por ICM N° P10/063-F, Proyectos FONDECYT N° 309-5007 a R.S-Z, N° 111-0392 a K.G. y N° 311-0050 a G.M.R.

Correo electrónico: geormrenard@yahoo.com.ar

Socio Patrocinante: Sotomayor-Zárate, R.

DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UN SISTEMA BIODEGRADABLE DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE MESILATO DE RASAGILINA PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON (Development and evaluation of a controlled-release biodegradable system of rasagiline mesylate for treatment of Parkinson's disease).

Fernández, M.^{1,2}; Negro, S.²; Slowing, K.³; Fernández-Carballido, A.²; Barcia, E.²

¹Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción. ²Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. ³Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente después del Alzheimer. La rasagilina es un potente IMAO-B, con propiedades neuroprotectoras, que ha mostrado ser eficaz en el tratamiento de la EP. El desarrollo de sistemas de liberación controlada para el tratamiento de la EP supondrían una mejora fundamental en el tratamiento de estos pacientes al mejorar su calidad de vida y reducir el número de administraciones. OBJETIVO: desarrollar una nueva formulación para el tratamiento de la EP, consistente en microesferas de mesilato de rasagilina (MR). METODOLOGÍA: Las microesferas fueron preparadas con PLGA 50:50 mediante la técnica de emulsión/evaporación del solvente a partir de una emulsión O/W. Las microesferas fueron caracterizadas por microscopía electrónica de barrido (SEM), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y rayos X (XRPD). Asimismo, se determinó la eficacia de encapsulación (EE) y se realizaron estudios de cesión *in vitro*. La evaluación de la eficacia de la formulación en un modelo animal de Parkinson de rotenona se llevó a cabo mediante ensayos de comportamiento (test de aquiesia, catalepsia y natación) y, mediante análisis histológico. RESULTADOS: el análisis por SEM mostró partículas esféricas con superficie lisa y ausencia de cristales de MR en la superficie. El tamaño medio de las microesferas fue de $103,1 \pm 20,2 \mu m$. Los análisis por DSC y XRPD indicaron que no se produjo una interacción específica entre MR y PLGA. Se obtuvo una EE de $52,8 \pm 2,3\%$, con una cesión de orden 0 de $63,3 \mu g/día/20mg$ de microesferas durante 2 semanas. Los resultados obtenidos en las pruebas de comportamiento demostraron la eficacia del MR en la reversión de la sintomatología. Mediante el análisis histológico de neuronas dopaminérgicas en sustancia negra se confirmaron estos resultados. CONCLUSIÓN: la formulación de microesferas de MR desarrollada constituye una alternativa interesante en el tratamiento de la EP.

Agradecimientos: Proyecto Fundación Mutua Madrileña (AP2696/2008). Beca Alβan N° E06D103774CL, Proyecto MECESUP UCO 0202 y Universidad de Concepción.

Correo electrónico: marferna@udec.cl

Socio Patrocinante: Gómez-Gaete, C.

DESARROLLO DE HERRAMIENTAS ANALÍTICAS ÚTILES PARA EL ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LA MILTEFOSINA SOBRE *LEISHMANIA* (Development of analytical tools useful to study the miltefosine mechanism of action on *Leishmania*).

Godoy-Ramos, R.^{1,2}, Imbert L.², Libong D.², Abreu S.², Loiseau P.M.³ y Chaminade P.².

¹ Laboratorio de Cromatografía y Lipidómica, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Concepción, Chile. ² Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud, EA4041, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud. ³ Groupe Chimiothérapie Antiparasitaire, UMR CNRS 8076, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud.

Leishmania donovani es un protozoo causante de la Leishmaniosis, una parasitosis endémica que afecta aproximadamente 90 países mayoritariamente en vías de desarrollo. Puede manifestarse como Leishmaniosis visceral (o Kala azar), cutánea, cutáneo-mucosa y difusa. En los últimos años el número de casos ha aumentado como consecuencia del desarrollo económico, cambios ambientales y fenómenos migratorios; además, la aparición del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) ha favorecido la co-infección. El tratamiento actual es la administración de drogas por vía intravenosa lo cual desfavorece la adhesión del paciente al tratamiento. Recientemente la miltefosina ha demostrado ser eficaz cuando se administra por vía oral. Aunque su mecanismo de acción ha sido investigado y tiene que ver principalmente con el metabolismo de los lípidos y especialmente los fosfolípidos, son necesarios más estudios para determinar con precisión cuáles vías metabólicas son afectadas.

En este contexto, se desarrollaron herramientas analíticas que se consideran en la interfase químico – biológica. Para este propósito se propone un estudio lipidómico enfocado en la membrana de fosfolípidos de cultivos de *Leishmania donovani* no-tratadas (NT), tratadas (T) y resistentes a miltefosina. Se desarrolló la separación y cuantificación de clases de fosfolípidos por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase normal (NP-HPLC) acoplada a un espectrómetro de masa (MS) y detector evaporativo de difusión de la luz (ELSD). Se realizó el análisis de los espectros full-scan MS usando análisis multivariado (OSC-PLS-DA) para resaltar las especies moleculares de interés en los 3 tipos de cultivos. Las clases afectadas por miltefosina fueron: PI; PS, PE, PC y LPC, con diferente distribución según el tipo de cultivo. El análisis por OSC-PLS-DA ofrece diferentes vías por las cuales podría explicarse el mecanismo de acción y de resistencia a miltefosina, y al mismo tiempo, identificar marcadores de susceptibilidad al fármaco.

Agradecimientos: Proyecto FONDECYT 11100214, CONICYT, CHILE. Beca ALBAN, Unión Europea.

Correo electrónico: rgodoy@udec.cl

Socio Patrocinante: Gómez-Gaete, C.

CONGRESO 2013: COMUNICACIONES ORALES

NUEVOS DERIVADOS DE ÁCIDO GÁLICO COMO POSIBLES AGENTES ANTINEOPLÁSICOS POTENTES Y SELECTIVOS (New gallic acid derivatives as potential potent and selective antineoplastic agents).

Jara, J.A.¹, Castro-Castillo V.², Madrid-Rojas M.², Peredo L.¹, Pavani M.¹, Ferreira J.¹.

¹Laboratorio de metabolismo energético y Cáncer, Facultad de medicina, Universidad de Chile. ²Laboratorio de Química Experimental, Departamento de Química, UMCE.

Las células tumorales presentan variadas diferencias metabólicas en relación a las células no transformadas, que pueden ser aprovechadas como herramientas farmacológicas para diseñar moléculas que actúen selectivamente. Entre las principales diferencias metabólicas de las células tumorales se encuentra la obtención de energía mayoritariamente a través de la vía glicolítica, a diferencia de las células no tumorales, que la obtienen vía fosforilación oxidativa. Sin embargo, ambos procesos están íntimamente relacionados en la células neoplásicas, ya que éstas utilizan el ATP sintetizado por la ATP sintasa para fosforilar la glucosa a glucosa 6-fosfato. Se observa también un aumento en la diferencia de potencial de membrana mitocondrial en las células tumorales (-180 mV), debido a diferencias estructurales de la membrana mitocondrial interna. Esta característica confiere a la cara interna de la membrana mitocondrial interna carga negativa, lo que hace posible que cationes sean atraídos selectivamente hacia las mitocondrias de éstas células. En este trabajo hemos sintetizado cationes lipofílicos derivados de ácido gálico, con el objetivo de que actúen en la mitocondria e interrumpen la síntesis de ATP. Evaluamos la citotoxicidad y selectividad de estos en células de tumor mamario murinas y humanas, los mecanismos de acción y el tipo de muerte celular. Se estudió el efecto sobre el consumo de oxígeno, el contenido de ATP, la liberación de LDH, la caída del potencial de membrana celular, y marcadores de apoptosis. Además, evaluamos la disminución del volumen de tumor en ratones tratados. Los compuestos muestran valores de IC₅₀ <10 µM y además un grado de selectividad relevante. Los derivados produjeron un efecto desacoplante a nivel mitocondrial, caída del potencial de membrana mitocondrial, disminución de ATP intracelular y signos de una muerte celular de tipo apoptótica. Además, se observó disminución del volumen del tumor sin la aparición de efectos tóxicos relevantes.

Agradecimientos: FONDECYT N° 1130772, Proyecto inserción en la academia N°791220004.

Correo electrónico: josejara@med.uchile.cl

FUNCIÓN DEL RECEPTOR LOX-1 EN LA INVASIÓN Y ANGIOGÉNESIS TUMORAL EN CÁNCER DE PRÓSTATA (function of LOX-1 receptor in tumor angiogenesis and invasion in prostate cancer).

González-Chavarría, I.¹, Cerro R.¹, Parra N.C.¹, Zúñiga F.A.³, Salas A.², Toledo J.R.¹.

¹Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas. ²Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas. ³Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología, Facultad de Farmacia. Universidad de Concepción.

La expresión y función del receptor para LDL oxidada LOX-1 se ha asociado a patologías como disfunción endotelial, aterosclerosis y obesidad. En estas patologías oxLDL/LOX-1 activa vías de señalización que promueven la proliferación, motilidad celular y angiogénesis. Estudios recientes demostraron la expresión de LOX-1 en células de cáncer de próstata (CaP) y en adenocarcinomas prostáticos humanos de estadios clínico patológicos caracterizados por la invasión local y la generación de metástasis, sin embargo su función en cáncer de próstata aún no ha sido dilucidada. Nuestro objetivo es analizar la contribución oxLDL/LOX-1 en la invasión y angiogénesis tumoral. Nuestros resultados utilizando modelos tumorales de CAP con sobre expresión [LOX-1(+)] y silenciamiento del receptor LOX-1 [LOX-1(-)] demuestran que la activación de LOX-1 por oxLDL incrementa la invasión tumoral y la expresión de las moléculas relacionadas a invasión tumoral como N-cadherina y Vimentina disminuyendo la expresión de marcadores epiteliales como E-cadherina, fenómenos que son prevenidos en modelos celulares de CaP LOX-1(-). Además, oxLDL/LOX-1 incrementa la expresión de marcadores pro-angiogénicos como VEGF, MMP-2 y MMP-9. En este sentido determinamos que la expresión de estas moléculas se potenciada en células de CaP con sobreexpresión de LOX-1 y se previenen con la utilización de un modelo celular *knock-down* para LOX-1. La utilización de líneas celulares de CaP LOX-1(+), CAP LOX-1(-) en xenografts sobre membranas corioalantoideas de embriones de pollo demuestran que oxLDL/LOX-1 generan un aumento en la angiogénesis del estroma asociado al tumor y su vascularización.

Agradecimientos: Fondecyt 112115; Beca de doctorado Conicyt 21110290; Proyecto CONICYT de Inserción en la Academia N°79112029.

Correo electrónico: ivangonzalez@udec.cl

Socio Patrocinante: Salas-Burgos, A.M.

PARTICIPACIÓN DE SINAPTOTAGMINA-I EN LA HIPOFUNCIÓN GLANDULAR EN PACIENTES CON SÍNDROME DE SJÖGREN Y ESTUDIO DE LA DINÁMICA DE DISTRIBUCIÓN DE Ca^{2+} EN ACINOS 3D (Role of Synaptotagmin-I in glandular hypofunction in Sjögren's syndrome patients and study of Ca^{2+} dynamics in 3D acini).

Cortés, J.¹, Hidalgo J.¹, Bahamondes V.¹, Urra H.¹, Barrera M.J.¹, Castro I.¹, Aguilera S.¹, González S.¹, Molina C.¹, Leyton C.¹ y González M.J.¹.

¹ Laboratorio Biología Celular, ICBM-Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El Síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad autoinmune, caracterizada por síntomas de sequedad bucal y ocular, debido a la disminución en la funcionalidad de las glándulas salivales (GS) y lacrimales. En GS labiales (GSL) de pacientes-SS se han observado cambios en la homeostasis de las células acinares, siendo la pérdida de polaridad celular uno de los más importantes. La polaridad celular es necesaria para mantenerla direccionalidad del proceso secretor; cambios en la polaridad podrían alterar la localización y funcionalidad de la maquinaria molecular que participa en la secreción, como se ha observado en componentes de la ruta exocítica (SNAREs y Rab3D). El aumento en la concentración de Ca^{2+} es el estímulo desencadenante de la exocitosis y Sinaptotagmina-I (Syt-I) es la proteína que actúa como nexo entre esta señal y la maquinaria exocítica. En análisis de microarreglos de cDNA se observó una sobreexpresión del mRNA de Syt- en GSL de pacientes-SS, las que además presentan una respuesta de Ca^{2+} menos sensible a la estimulación con acetilcolina. En base a estos antecedentes, se evaluaron los niveles de expresión y localización de Syt-I en GSL de pacientes-SS y controles y se caracterizó la señal de Ca^{2+} en células derivadas de glándula submandibular humana (HSG) cultivadas en tres dimensiones (3D). En GSL de pacientes-SS se observó un aumento significativo en la expresión e inmunoreactividad de Syt-I, sin cambios en su localización subcelular. En acinos 3D, se observó que la señalización de Ca^{2+} es dependiente del Ca^{2+} extracelular y de la polaridad celular.

El aumento en la expresión de Syt-I en pacientes-SS, podría indicar cambios en la señalización de Ca^{2+} . Los acinos 3D podrían ser útiles para evaluar la sobreexpresión de Syt-I y su efecto en la exocitosis, dada la similitud de su señalización de Ca^{2+} con la de los acinos de GSL.

Agradecimientos: FONDECYT 1120062, Beca Conicyt (JC, HU, MJB), Beca apoyo a la realización de tesis.

CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN *IN SILICO* DE LAS REDES BIOQUÍMICAS INVOLUCRADAS EN EL METABOLISMO DE LA VITAMINA C EN HUMANOS (Construction and characterisation *in silico* modeling of biochemical-networks involved in the vitamin C metabolism in humans).

Muñoz, C.A.¹, Roa F.J.¹, Rivas C.I.¹, Salas-Burgos A.M.² y Vera J.C.¹

¹Departamento de Fisiopatología, ²Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

El metabolismo de la vitamina C en células humanas, comprende reacciones que involucran los procesos de transporte y reciclaje de la vitamina C. Además, se ha reportado que existe una interdependencia funcional de esta vitamina con el metabolismo del glutatión, en cuanto al papel protector antioxidativo y la mantención de la forma reducida de la vitamina C. Todas estas reacciones actúan concertadamente en un contexto temporal y espacial dentro de la célula, manteniendo así altas concentraciones de ascorbato intracelular. Sin embargo, una comprensión más detallada del metabolismo de esta vitamina, involucra un análisis más complejo que el simple conocimiento de las reacciones bioquímicas que han sido descritas experimentalmente. Por lo tanto, en este trabajo se propuso integrar todas las reacciones involucradas en el metabolismo de la vitamina C, generando una red metabólica dinámica que sea capaz de describir y predecir el comportamiento de este sistema biológico. Por otra parte, uno de los organelos centrales para la mantención de la capacidad antioxidante celular corresponde a la mitocondria, en donde la vitamina C parece jugar un papel fundamental en la mantención de la homeostasis redox. Por consiguiente, se planteó enfocar esta investigación en el análisis de la readecuación de las reacciones y su influencia sobre el metabolismo mitocondrial de la vitamina C. Para ello, mediante el software CellDesigner 4.3, se construyeron los modelos de redes metabólicas desde la información descrita en literatura, con énfasis en distintos compartimentos celulares. Luego se procedió al establecimiento de ecuaciones de velocidad y de parámetros cinéticos, para cada una de las reacciones. Posteriormente, se llevaron a cabo simulaciones basadas en métodos determinísticos para predecir la dinámica del sistema. Así, se logró identificar especies claves que alteran el metabolismo mitocondrial de la vitamina C, tales como glutatión y presencia de transportadores de vitamina C en distintos compartimentos celulares.

Agradecimientos: Proyectos FONDECYT 1090501 y 1130842. Proyecto CONICYT de Inserción en la Academia N°79112029

Correo electrónico: carolinaamunoz@udec.cl

Socios Patrocinantes: Salas-Burgos A.M. y Vera J.C.

CARACTERIZACIÓN DE UNA DERMIS ARTIFICIAL XENOGÉNICA BASADA EN BIOPOLÍMEROS CON POTENCIAL USO FARMACOLÓGICO COMPUESTA POR GELATINA/QUITOSANO/ÁCIDO HIALURÓNICO Y SU APLICACIÓN EN MEDICINA REGENERATIVA DE LA PIEL.

Fuentes, M.A.¹, Weinstein C.², Enríone J.³, Forero J.C.¹, Sánchez E.¹, Brown D.⁴, Acevedo C.A.¹

¹ Centro de Biotecnología, Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile. ² Departamento de Bioquímica, Facultad de Farmacia, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile. ³ Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Santiago, Chile. ⁴ Departamento de Biología y Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso, Chile.

A nivel global millones de personas sufren heridas en la piel producto de traumas y enfermedades, generando un gran deterioro en la calidad de vida de quienes las padecen. Los tratamientos convencionales utilizados a nivel clínico se basan en autoinjertos, sin embargo estos presentan algunos inconvenientes como: poca disponibilidad para grandes quemados, formación de cicatrices hipertróficas, poca vascularización, falta de sensibilidad y cambios en la pigmentación. Frente a estas complicaciones la ingeniería de tejidos puede proveer de metodologías que permiten mejorar la reparación de una herida, mediante la generación de sustitutos de piel (dermis artificial) basados en la utilización de biomateriales, los cuales pueden ser funcionalizados para su potencial aplicación farmacológica. En este trabajo se formuló y caracterizó una dermis artificial basada en biopolímeros (gelatina, quitosano y ácido hialurónico) para aplicaciones futuras en implantes de piel. Se realizó una caracterización física a través de Calorimetría Diferencial de Barrido, Picnometría de Gas y Microscopía Electrónica de Barrido. Se optimizó la formulación variando la concentración de gelatina y entrecruzante. Se evaluó el comportamiento biológico de fibroblastos dérmicos en el biomaterial utilizando técnicas histológicas y ensayos de crecimiento celular. Los resultados indican que el crecimiento celular de los fibroblastos es fuertemente influenciado por variaciones de la formulación. Por otro lado, las propiedades físicas del material resultante se afectan significativamente por la concentración de los biopolímeros, en especial, la cantidad de gelatina agregada. Podemos concluir que la adición de gelatina es la variable que más afecta las propiedades físicas, químicas y biológicas del producto.

Agradecimientos: Proyecto FONDECYT 1120166

Correo electrónico: miguel.angel.fuentes@hotmail.com

Socio Patrocinante: Weinstein, C.

UTILIZACIÓN DE QUITOSANO Y GELATINA COMO BIOMATERIALES PARA EL DESARROLLO DE UN SOPORTE POLIMÉRICO Y SU POTENCIAL USO FARMACOLÓGICO EN MEDICINA REGENERATIVA.

Forero, J.C.^{1, 2}, Osses N.², Weinstein C.³, Fuentes M.A.¹, Acevedo C.A.¹

¹ Centro de Biotecnología, Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile. ² Instituto de Química, Facultad de Ciencias Básicas y Matemáticas, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile. ³ Departamento de Bioquímica, Facultad de Farmacia, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile.

La medicina regenerativa es un área emergente multidisciplinar que involucra la participación de algunas disciplinas, tales como: química, biología, física, farmacia, medicina e ingeniería. El propósito principal de esta, es promover tecnologías para la reparación y el reemplazo de tejidos y órganos utilizando biomateriales que pueden ser asociados con aplicaciones farmacológicas, empleando estos como vehículos de fármacos y factores de crecimiento. Entre los numerosos materiales que han sido evaluados para la fabricación de soportes en medicina regenerativa, el quitosano con sus propiedades antimicrobianas y la gelatina con su propiedad de adhesión celular ofrecen una combinación única que tiene un inmenso potencial para servir como matriz polimérica en la ingeniería de tejidos. En el presente estudio se desarrolló un soporte 3D poroso bajo la técnica de liofilización, formulado con quitosano/gelatina y entrecruzado con glutaraldehído. Se ejecutaron ensayos a diferentes temperaturas de congelamiento para determinar el efecto de ésta en las características morfológicas y físicas del material. Se realizaron micrografías por Microscopía Electrónica de Barrido donde se cuantificó la dimensión de los poros, reportando un tamaño entre 110-140 µm. La porosidad del soporte se determinó a través de picnometría de gases obteniendo una porosidad entre 97-99%. La caracterización física del soporte fue evaluada por Calorimetría Diferencial de Barrido obteniendo una temperatura de transición vítrea entre 37-40°C. La liofilización se llevó a cabo durante 6 horas con un gradiente de temperatura constante que partió a -55°C. Los resultados obtenidos en el desarrollo del biomaterial con respecto al efecto de la temperatura de congelamiento muestra la incidencia de ésta en algunas características de vital importancia para la bioimitación de la matriz extracelular; por otra parte, estos resultados hasta la fecha nos conducen a la posible utilización del soporte para cultivo y crecimiento de osteoblastos en regeneración ósea.

Agradecimientos: Proyecto FONDECYT 1120166.

Correo electrónico: juan.forero.12@sansano.usm.cl

Socio Patrocinante: Weinstein, C.

DESARROLLO Y ESTUDIO *IN VITRO* DE MICROESFERAS DE METILPREDNISOLONA FORMULADAS PARA EL TRATAMIENTO ANTINFLAMATORIO LOCAL DE ENFERMEDADES REUMÁTICAS POR VÍA INTRA-ARTICULAR (Development and *in vitro* studies of polymeric methylprednisolone microspheres intended for local antinflammatory treatment of rheumatic diseases by intra-articular injection).

Gallegos-Caamaño, C.¹, León Farfán J.¹, MSc. Bustos Araya P.², Dra. Gómez-Gaete, C.¹

¹ Laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción.

² Laboratorio de Inmunología, Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción.

Las microesferas (MS) son sistemas de liberación controlada de fármacos con características ideales para su aplicación en espacios biológicos confinados, como las articulaciones. Una matriz elaborada de polímero biocompatible y biodegradable permitiría sostener el efecto y garantizar su seguridad, pues impide la formación de cristales en la formulación. Objetivos: Fabricar MS con el copolímero de los ácidos láctico y glicólico (PLGA) y el corticoide metilprednisolona (MP). Determinar su morfología, diámetro, potencial zeta, capacidad de encapsulación y cinética de liberación de MP. Evaluar su posible citotoxicidad y su efecto antiinflamatorio *in vitro*. Metodología: Para fabricar MS se utilizó el método de emulsión-evaporación de solvente. Su morfología fue determinada por microscopía electrónica de barrido, su diámetro por granulometría y su potencial zeta por movilidad electroforética. La MP encapsulada y su cinética de liberación *in vitro*, fueron cuantificadas indirectamente por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Para evaluar su posible citotoxicidad se realizaron cultivos de células THP-1 con distintas concentraciones de MS blancas (MSb) o cargadas con MP (MSc), en los que se midió viabilidad celular y producción de interleuquina 1-beta (IL-1 β). Finalmente, para estudiar su efecto antiinflamatorio *in vitro* se realizaron cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP), aisladas de 5 pacientes con artritis reumatoide (AR) y de 5 donantes sanos, con distintas concentraciones de MSc. En éstos se evaluó respuesta de proliferación frente a fitohemaglutinina (PHA), nivel de estrés oxidativo y producción de IL-1 β . Resultados: Las MS resultaron esféricas, de superficie lisa y tamaño monodisperso, con un diámetro de $5,6 \pm 2,2 \mu\text{m}$ y potencial zeta de $-2,9 \text{ mV}$. Las MSb disminuyeron la viabilidad celular y estimularon la producción de IL-1 β de forma concentración dependiente. En cambio, las MSc no tuvieron impacto en estos parámetros a concentraciones terapéuticas. Por otro lado, las MSc disminuyeron significativamente la producción de IL-1 β en los cultivos de CMSP de pacientes con AR y redujeron la respuesta proliferativa y el nivel de estrés oxidativo en cultivos de pacientes y de controles. Conclusión: Las MS desarrolladas poseen características óptimas para su uso vía inyección intra-articular y representan una alternativa innovadora para el tratamiento local de la inflamación en enfermedades reumáticas.

Agradecimientos: Proyecto FONDECYT 11080101 y Proyecto INNOVA 12.35-EM.TES (12.150).

CONGRESO 2013: COMUNICACIONES EN PÓSTER

P001. EL ENTACTÓGENO MDMA (3,4 METILENDIOXIMETANFETAMINA, "ÉXTASIS") Y SU ANÁLOGO BROMADO EN C(2) AUMENTAN LA POTENCIACIÓN DE LARGO PLAZO (LTP) EVOCADA *IN VIVO* EN CORTEZA PREFRONTAL DE RATAS SPRAGUE-DAWLEY (The entactogen MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine, "Ecstasy") and its brominated derivative at C(2) enhance long-term potentiation (LTP) evoked *in vivo* in the prefrontal cortex of Sprague Dawley rats)

Muñoz-Valdivia, S.^{1,2}, Streich, L.³, Castro-Castillo, V.⁴, Hernández, A.⁵ y Sáez-Briones, P.^{1,2}

¹Laboratorio de Neurofarmacología y Comportamiento, Escuela de Medicina, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Santiago de Chile. ²Escuela de Medicina, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Santiago de Chile. ³Studiengang Biophysik, Goethe Universität, Frankfurt am Main, Deutschland. ⁴Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación. ⁵Laboratorio de Neurobiología, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile.

El consumo de MDMA (3,4-metilendioximetanfetamina, "éxtasis") se asocia con efectos deletéreos sobre la cognición. La evidencia experimental en modelos animales es, no obstante, contradictoria y relacionada con exposición crónica. Por otro lado, no hay estudios similares asociados a la exposición aguda de MDMA o sus análogos. En este trabajo, se evaluó los efectos agudos de MDMA y 2Br-MDMA (2-bromo-4,5-metilendioximetanfetamina) sobre la inducción *in vivo* de potenciación de largo plazo (LTP) en corteza prefrontal. Ratas Sprague-Dawley macho (200-230 g), fueron inoculadas por vía intraperitoneal con MDMA ó 2Br-MDMA en dosis únicas disueltas en suero fisiológico. La inoculación se realizó 30 minutos antes de anestesiarse al animal (uretano, 1.3 g/Kg) y someterlo a intubación traqueal, para luego conectarlo a una bomba respiratoria y fijarlo en un sistema estereotáxico. Posteriormente, se trepanó el cráneo en 2 puntos equidistantes del bregma localizados a nivel prefrontal, en los cuales se posicionaron un electrodo de estimulación y uno de registro, respectivamente. La LTP se indujo mediante tetanización (10 trenes de 300 Hz y 500 ms de duración c/u, aplicados cada 10 s). Los resultados obtenidos indican que tanto MDMA como 2Br-MDMA son capaces de inducir un aumento estadísticamente significativo de la LTP. Estos efectos se verifican a partir de los 15 minutos post inducción y se mantienen a lo menos hasta el final del experimento (60 minutos), no existiendo diferencias cualitativas significativas en los respectivos perfiles temporales. Lo anterior no sólo complementa los resultados ya publicados respecto de la inducción de LTP por MDMA en modelos *in vitro*, sino que muestra que la bromación aromática en C(2) conserva los efectos potenciadores de la droga de referencia, en contraposición a sus efectos disruptores sobre los perfiles conductuales asociados a la actividad psicomotora espontánea e interacción social típicas de MDMA.

Agradecimientos: Proyecto DICYT –USACH 021001SB.

Correo electrónico: sonia.munoz@usach.cl

Socio Patrocinante: Sáez Briones, P.

P002. EFECTOS NEUROPROTECTORES DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE DE BAJA GLICOSILACIÓN.

Castillo, C.^{1,2}, Zaror S.¹, Sotomayor, K.¹, Jimenez S.¹, González M.¹, Salgado E.¹, Araya J.², Fuentealba J.², Jorge R Toledo¹.

1: Laboratorio Biotecnología y Biofármacos, Dpto Fisiopatología, Fac Cs Biológicas, Universidad de Concepción. 2: Laboratorio Screening compuestos neuroactivos, Dpto Fisiología, Fac Cs Biológicas, Universidad de Concepción.

La eritropoyetina (EPO) es una hormona glicoproteica que principalmente regula la hematopoyesis, pesa aproximadamente 34 kDa y se compone de 165 aminoácidos, que constituyen el 60% de su peso, tiene sitios potenciales de N-y O-glicosilación en los residuos de Asn 24, 38, 83 y Ser 126, respectivamente que también tienen terminales de ácido siálico, características que están directamente relacionados con su farmacocinética y farmacodinamia. El descubrimiento del receptor de EPO (EpoR) en tejido no-eritroide, como en el sistema nervioso central (SNC), sugiere la producción de la hormona en estos tejidos. Además se ha observado que la administración de EPO exógena protege al SNC contra diferentes formas de daño neuronal, como estrés oxidativo o isquemia, sin embargo, como esta molécula provoca un aumento en el hematocrito, su uso farmacológico directo puede empeorar la lesión cerebral. Considerando esto se produjo una variante de EPO recombinante humana (rhEPO) con un bajo nivel de glicosilación. Para esta producción de rhEPO se utilizó un sistema de transducción directo en glándulas mamarias de cabra con vectores adenovirales, que asegura la producción de una variante de bajo nivel de glicosilación y carente de ácido siálico, con un efecto directo sobre la disminución de la actividad hematopoyética. Esta variante sería similar a la denominada "neuro-EPO" y ha demostrado tener efectos neuroprotectores. Nuestros resultados obtenidos permiten concluir que rhEPO obtenida desde leche de cabra tiene un alto potencial farmacológico como agente neuroprotector sobre la base de las características específicas de: eficacia de la expresión, la reducción de glicosilación, sin actividad hematopoyética y protección de la apoptosis inducida por el estrés oxidativo en las líneas celulares y neuronas corticales de rata.

Agradecimientos: Fondef D09I1262, Fondecyt 11090091

Socio Patrocinante: Fuentealba, J.

P003. ESTUDIOS SOBRE EL EFECTO DEL COBRE EN LA RED DE PROTEÍNAS DEL CITOESQUELETO Y SU PAPEL EN LOS SISTEMAS DE DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS.

Maricella Delgado^{1,2,3}, Mario Piñones^{1,3}, Karina Cortés^{1,2,3}, Martha Naranjo^{1,3}, Andrea Briceño², Patricia Muñoz², Mónica Villa², Gloria Garrido², Macarena Tapia^{1,2,3}, Sandro Huenchuguala², Carlos Cuevas², Ulises Ahumada², Catalina Meléndez², Sebastián Castillo², Andrea Herrera², Marianela Arévalo³, Gabriela Díaz-Véliz², Sergio Mora², Juan Segura-Aguilar², Irmgard Paris^{1,2}.

¹ Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Santo Tomás, Viña del Mar, Chile. ² Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile. ³ Escuela de Tecnología Médica, Universidad Santo Tomás, Viña del Mar, Chile.

La Enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo que afecta a la vía nigroestriatal. Esta enfermedad se caracteriza por una pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta. Dentro de los mecanismos que podrían estar relacionados con el desarrollo de esta patología podemos encontrar agentes medioambientales como la exposición a ciertos metales, por ejemplo, el cobre. En otros trabajos se ha demostrado que la toxicidad de este metal es dependiente de la formación de un complejo con dopamina (CuDA), el transporte específico a través del transportador de dopamina (DAT) y la oxidación de dopamina a aminocromo en este complejo. Recientemente, se reportó que el complejo CuDA induce autofagia y aminocromo induce disrupción del citoesqueleto mediante la formación de agregaciones de α - y β -tubulina, sugiriendo que aminocromo podría jugar un rol en la disfunción de los sistemas de degradación de proteínas observados en la EP. Además, se ha descrito que la proteína desacetilasa de histona 6 (HDAC6) y los microtúbulos son requeridos para la degradación autofágica de agregados proteicos. La hipótesis de este trabajo busca demostrar que la toxicidad del cobre está relacionada con alteraciones y cambios en la expresión de proteínas que participan en la formación y estabilización de microtúbulos como γ - y β -tubulina, α -tubulina acetilada así como también de proteínas que participan en los procesos de autofagia y agresomas para la eliminación de proteínas dañadas mediado por HDAC6. Para ello se utilizaron como modelos: una línea celular SH-SY5Y derivada de neuroblastoma humano y cortes de cerebro de ratas para sustancia negra y cuerpo estriado. Los resultados mostraron que los mayores efectos tóxicos en células SH-SY5Y fueron obtenidos cuando las células se incubaron con el complejo CuDA. Además se observó la formación de agregados de γ -tubulina, β -tubulina y HDAC6 en células SH-SY5Y. Los resultados obtenidos de las inmunohistoquímica en estriado y sustancia negra de rata mostraron que cobre induce significativamente cambios en la expresión de proteínas en sustancia negra y estriado de rata como β -III tubulina, α -tubulina acetilada, y HDAC6. Estos resultados sugieren que cobre puede generar alteraciones en proteínas que participan en las vías de degradación de proteínas dañadas y que mecanismos compensatorios podrían estar participando.

Agradecimientos: Financiado por los proyectos Universidad Santo Tomás N000012858; Proyecto Fondecyt 1120337 y 1100165.

P004. ESTUDIOS SOBRE EL EFECTO DE AMINOCROMO EN LA RED DE PROTEÍNAS DEL CITOESQUELETO Y SU PAPEL EN LOS SISTEMAS DE DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS.

Gloria Garrido², Andrea Briceño², Karina Cortés^{1,2}, Patricia Muñoz², Mónica Villa², Maricella Delgado^{1,2}, Macarena Tapia^{1,2}, Sandro Huenchuguala², Carlos Cuevas², Ulises Ahumada², Catalina Meléndez², Sebastián Castillo², Andrea Herrera², Juan Segura-Aguilar², Irmgard Paris^{1,2}.

¹ Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Santo Tomás, Viña del Mar, Chile. ² Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa que afecta el sistema nervioso y es caracterizado por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra pars compacta (SNpc). A pesar de la intensa investigación que actualmente existe, los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de esta enfermedad aún no son evidenciados. Algunos estudios muestran que la EP está asociada con la formación de agregados de proteínas intracitoplasmáticas (cuerpos de Lewy) en neuronas de la SNpc y otras áreas del cerebro. Varias investigaciones sugieren que existe una disregulación en los sistemas de autofagia/agresomas los cuales podrían ser responsables de la acumulación de proteínas anormales u organelos dañados en esta enfermedad. Recientemente nosotros reportamos que aminocromo induce disrupción del citoesqueleto induciendo agregación de proteínas como α - and β -tubulin. El complejo dineína-dinactina ha sido involucrado en los mecanismos de autofagia/agresomas y en las vías de degradación lisosomal participando en la eliminación de agregados de proteínas. Asimismo, el transporte de autofagosomas y agresomas hacia lisosomas es mediado por microtúbulos en asociación con el complejo dineína-dinactina. Esta investigación prueba la hipótesis que aminocromo altera proteínas que forman parte del citoesqueleto y afecta el complejo dineína-dinactina induciendo así disfunción en los sistemas de degradación de proteínas. Para ello nosotros utilizamos como modelo la línea celular humana SH-SY5Y. Los resultados mostraron que aminocromo induce significativamente la muerte de células SH-SY5Y diferenciadas. En estas condiciones nosotros observamos cambios en la expresión y agregación de proteínas del citoesqueleto y de proteínas involucradas en los mecanismos de eliminación de proteínas dañadas. Estos resultados sugieren que aminocromo podría tener un papel importante en los sistemas de degradación de proteínas mediado por alteraciones en la red de proteínas del citoesqueleto como es observado en la EP.

Agradecimientos: Financiado por los proyectos Universidad Santo Tomás N000012858; Proyecto Fondecyt 1120337.

P005. DETERIORO COGNITIVO ASOCIDO A HIPOXIA HIPOBÁRICA INTERMITENTE (Cognitive impairment associated with intermittent hypobaric hypoxia).

Díaz-Cisternas, Paulina¹, Siques Patricia², Brito Julio², Calffio Camila¹, Orellana Roberto¹, Barrios Luis¹, Aguayo Héctor¹, Araya Giancarlo¹, Lamas Gabriela¹, Flores Karen¹, Díaz Pilar¹, Rojo Leonel E.^{*1}

¹Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Arturo Prat #2120, Iquique. ²Instituto de Estudios de la Salud. Medicina de Altura, Universidad Arturo Prat 2120, Iquique, Chile.

Estudios recientes han descrito una asociación entre la exposición a hipoxia hipobárica (HH), que se produce a gran altura con la disminución de velocidad de reacción, memoria y aprendizaje. Algunos problemas derivados de HH han sido relacionados con daño por especies reactivas del oxígeno y nitrógeno. Más aún, algunos estudios clínicos, indican que la administración de ácido ascórbico, podría revertir efectos negativos por aumento de ROS en enfermedades de altura; como hipertensión pulmonar, entre otras. En el presente trabajo, se utilizó, un modelo animal, expuesto a hipoxia hipobárica intermitente, (homólogo del modelo de exposición de los trabajadores de grandes alturas); comprado con un grupo crónico y normóxico, con el objetivo de determinar, si la exposición intermitente, produciría deterioro cognitivo, alteraciones histopatológicas cerebrales y variaciones del status antioxidante plasmático. Se utilizaron ratas Wistars, las que fueron expuestas a hipoxia en una cámara hipobárica a 428 Tor (4.600m), por 30 días. Se analizaron tres grupos experimentales: normoxia (NX; n=8), hipoxia intermitente (HHI; n=8) e hipoxia crónica (HHC; n=8). Se evaluaron, alteraciones de memoria, utilizando el Laberinto de Morris (MWM). La presencia de marcadores neuropatológicos mediante tinciones de H&E y tiotflavina T en las regiones CA1, CA3 y Giro Dentado del hipocampo del cerebro de los grupos al final del protocolo y los cambios en el estado antioxidante del plasma en los tres grupos de estudio. Los resultados indican que los animales bajo condiciones de HHC sufren un deterioro significativo de la memoria visuo-espacial, igual que en exposición crónica comparados con el grupo NX (p<0.05) y que la alternancia con periodos de normoxia (HHI) no muestra un efecto protector sobre la memoria (p<0.05). También se observó una disminución de la celularidad e indicadores de muerte neuronal en las regiones CA1, CA3 y DG en los grupos HHI y HHC en comparación con animales bajo normoxia. Se observaron diferencias en el status antioxidante que no alcanzaron significancia estadística.

Agradecimientos: Facultad de Ciencias de la Salud (UNAP), Instituto de Estudios de la Salud. Medicina de Altura (UNAP), Facultad de Recursos Renovables-UNAP, Instituto de Biotecnología de Tarapacá (IBT-CORDUNAP). Beca UNAP-GORE: 20405030059. Tesis Alteraciones Cognitivas Asociadas a la Permanencia en Grandes Alturas

Correo electrónico: paulina.diaz.cisternas@gmail.com

Socio Patrocinante: Rojo, L.E.

P006. DESREGULACION DE RECEPTORES GLUTAMATERGICOS Y KINASAS RELACIONADAS A PLASTICIDAD EN EL HIPOCAMPO DE UN MODELO ANIMAL DE AUTISMO (Deregulation of glutamatergic receptors and plasticity related kinases in the hippocampus of an animal model of autism).

Peralta, F.A., Valencia M., Estay S., Santander O., Aliaga E.

Laboratorio de Neurociencias, Escuela de Kinesiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

El Espectro de Trastorno Autista (ASD) corresponde a un conjunto de desórdenes del neurodesarrollo, el cual presenta profundas alteraciones en la sociabilidad, el lenguaje y el procesamiento sensorial, junto a conductas estereotipadas y ansiosas. Evidencia reciente apunta a una hiperplasticidad en el cerebro autista, probablemente relacionados al sistema de neurotransmisión glutamatergico y vías de transducción de señales relacionadas a plasticidad. Entre las moléculas relacionadas a plasticidad interesantes en esta enfermedad se encuentran los receptores glutamatergicos metabotrópicos de Grupo I (mGluR1a y mGluR5) e ionotrópicos de tipo NMDA (subunidades NMDA NR1, NR2A y NR2B), así como la proteína quinasa mTOR (*proteína blanco de rapamicina de mamífero*), Akt (*proteína transformante del retrovirus Akt-8*), ERK (*quinasa regulada por señales extracelulares*) y CaMKII (*quinasa activada por Ca²⁺/Calmodulina I*).

Nos planteamos estudiar la expresión y activación de las kinasas antes mencionadas junto a los receptores glutamatergicos metabotrópicos de Grupo I y subunidades del receptor NMDA, durante el desarrollo del hipocampo de un modelo de autismo en rata. El modelo de autismo consiste en el tratamiento prenatal con valproato de sodio (450mg/Kg i.p.) en el día embrionario 12,5. El modelo se validó conductualmente mediante test de interacción social, ansiedad, conductas repetitivas y actividad locomotora al día postnatal 30. Cada molécula se detectó a los días postnatales 9 y 30, mediante inmunohistoquímica cromogénica en cortes coronales de cerebro de rata y, en el caso de las kinasas, mediante western blot de hipocampo.

El tratamiento prenatal con valproato altera principalmente la expresión de mGluR1a y CaMKII, junto a la fosforilación de ERK (Thr202-Tyr204) de forma tiempo y subregión específica. Los otros marcadores no presentaron cambios o presentaron cambios leves. Los resultados permiten visualizar nuevos blancos farmacológicos para autismo.

Agradecimientos: Financiado por Proyecto FONDECYT-1110855, VRIEA PUCV proyecto 127.707/2012

Correo electrónico: francisco.andres.peralta@gmail.com

Socio Patrocinante: Sotomayor-Zárate, R.

P007. TOXINAS OBTENIDAS DE HETEROSIGMA AKASHIWO (HaTX), INHIBIEN LA ACTIVIDAD NEURONAL, INDUCIENDO UNA DESORGANIZACION SINAPTICA EN CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS HIPOCAMPALES DE RATA (Toxins obtained from Heterosigma Akashiwo (HaTX), inhibit the neuronal activity, inducing a synaptic desorganization in primary cultures of rat hippocampal neurons).

Ramírez, A.E.¹, Araya J.¹, Castillo C.¹, Astuya Allisson^{2,3}, Aballay Ambbar^{2,3}, Fuentealba J.¹

¹Laboratorio de Screening de Compuestos Neuroactivos, Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción. ²Cell Culture and Marine Genomics Laboratory, Marine Biotechnology Unit, Natural and Oceanographic Sciences, University of Concepcion. PO Box 160-C, Concepción, Chile. ³Sur-Austral Copas Program. University of Concepción, Concepción, Chile. PO Box 160-C, Concepción, Chile.

Heterosigma akashiwo (*Raphidophyceae*), es una alga marina unicelular presente en Chile, que ha sido asociada a muertes masivas de poblaciones de peces en todo el mundo. Si bien los factores que desencadenan su toxicidad son controversiales, al parecer pudiesen estar asociados a un efecto paralítico dependiente de la concentración, que ha sido reportado en la literatura. En el presente trabajo, evaluamos el efecto agudo de un extracto purificado de toxinas obtenidas de Heterosigma akashiwo (HaTX), en cultivos primarios de hipocampo de rata, mediante técnicas de Patch-Clamp, Fluorometría de Calcio e Inmunocitoquímica. Los resultados indican que tratamientos agudos con la HaTX (0,5%v/v), inducen una disminución en la actividad de la red neuronal, evidenciado por una disminución en la frecuencia (control 16,19 ± 2,90 Hz vs HaTX 7,15 ± 1,67 Hz) y amplitud (control 315,8 ± 9,7 pA vs 118,6 ± 2,2 pA) de los eventos. En correlación con este resultado, se observó que la HaTX induce una reducción en la frecuencia de las transitorias de calcio intracelular (control 4,5 ± 0,2 Hz vs HaTX 2,1 ± 0,3 Hz), ambos eventos asociados a una disminución en generación y transmisión de los potenciales de acción, lo que sugiere un bloqueo de la actividad de la red neuronal. En ambos casos, el efecto de la HaTX fue reversible al retirar la HaTX, recuperándose aproximadamente en un 70% la actividad neuronal. Adicionalmente los resultados obtenidos por inmunocitoquímica muestran que la HaTX, induce un cambio en el patrón de marcaje de SV2, sugiriendo una desorganización de la sinapsis. Estos datos nos permiten concluir que el efecto neurotóxico de la HaTX (rápido y reversible), está asociado a una desorganización en la estructura sináptica e inhibición de la transmisión nerviosa, y representa un potencial desarrollo para nuevos fármacos anestésicos.

Agradecimientos: Proyecto Fondecyt 1130747.

Correo electrónico: alejramirez@udec.cl

Socio Patrocinante: Fuentealba, J.

P008. EFECTO SINÉRGICO DE LOS ALCALOIDES CONTENIDOS EN UN EXTRACTO ALCALOIDEO DE TELINE MONSPESSULANA, EN EL EFECTO NEUROPROTECTOR OBSERVADO EN UN MODELO NEURONAL IN VITRO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (Synergic effect of the alkaloids present in an alkaloid extract of *teline monspessulana*, on the neuroprotector effect observed in a *in vitro* neuronal model of the alzheimer's disease).

Figueroa, D.F.¹, Araya J. A.¹, Ramírez A. E.¹, Sotes G.², Fuentes F.², Guzmán L.³, Aguayo L.G.³, Pérez C. I.², Fuentealba J.¹

Carrera: Biología, Universidad de Concepción, Laboratorio de Screening de Compuestos Neuroactivos. ¹Laboratorio de Screening de Compuestos Neuroactivos, ²Laboratorio de Neurofisiología, Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas; ³Laboratorio de Química de Productos Naturales, Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas; Universidad de Concepción.

Actualmente, se estima que en personas mayores de 85 años la prevalencia de padecer Enfermedad de Alzheimer (EA) puede alcanzar al 50%. La causa de la enfermedad es desconocida, una de las teorías más importante desde el punto de vista terapéutico es la teoría colinérgica, fundamental en la expansión del conocimiento de la EA. Existen evidencias sobre la participación colinérgica en la fisiopatología de la EA, que involucran la modulación de receptores neuronales de acetilcolina (nAChR). Estudios previos muestran que la estimulación persistente de ciertos subtipos de nAChR ($\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 7$) protege contra la neurotoxicidad inducida por el péptido A β . Así, la búsqueda de compuestos que ejerzan una acción similar a nicotina, y selectiva sobre receptores nicotínicos, sin los efectos adictivos de esta, se vuelve atractiva como blanco de desarrollo farmacológico. Por ello, probamos si citisina y otros alcaloides contenidos en el extracto de las semillas de *T. monspessulana*, tienen un efecto protector frente la toxicidad del péptido β -amiloide (βA) en un modelo neuronal *in vitro* de la EA. En ensayos preliminares, se observó que la disminución en la frecuencia de las transitorias de Ca^{2+} inducida por βA (Control 100±3.3 vs βA 60.9±3.1%), se pudo recuperar con mayor intensidad en presencia del extracto total (TM: 81 ng/mL), que en presencia de citisina (Cit: 53 ng/mL) (βA +Cit= 90.3±4.4; βA +TM= 111.1±5.4). Por otro lado, la viabilidad mostró un 26.5±45% de recuperación, en presencia de TM, en comparación con las neuronas tratadas con A β . Adicionalmente, la cuantificación de los western blots mostró un aumento de 112.9±30.4% de los niveles de BCl2 en presencia TM, en comparación con A β (87.3±25.9 %). Por lo tanto podemos concluir que el extracto total de alcaloides de *T. monspessulana* es un buen candidato como blanco farmacológico para el desarrollo de tratamientos para enfermedades neurodegenerativas como la EA.

Correo electrónico: dfigueroa@udec.cl

Socio Patrocinante: Fuentealba J.

P009. METILFENIDATO NO ALTERA EL DESEMPEÑO VISUOESPACIAL EN RATAS ADULTAS JÓVENES PERO FACILITA LA POTENCIACIÓN DE LARGO PLAZO *IN VIVO* (Methylphenidate does not impair visuo-spatial learning in young adult rats but enhances long term potentiation *in vivo*).

Burgos, H.^{1,2}, Cofré C.¹, Agurto R.³, Morales B.⁴, Hernández A.⁵, Sáez-Briones P.⁶ y Zeise M.¹

¹Escuela de Psicología, Facultad de Humanidades, Universidad de Santiago de Chile. ²Instituto Internacional para el Desarrollo Cognitivo, Universidad Central de Chile. ³Escuela de Psicología, Facultad de Ciencias Jurídicas y Sociales, Universidad Autónoma de Chile. ⁴Laboratorio de Neurociencia, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile. ⁵Laboratorio de Neurobiología, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile. ⁶Laboratorio de Neurofarmacología y Comportamiento, Escuela de Medicina, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Santiago Chile.

Metilfenidato (MPH) es un fármaco psicoactivo de recurrente prescripción médica en personas con déficit atencional. Es conocida su acción en transportadores catecolaminérgicos. Existe evidencia de alteración del desempeño en aprendizaje en altas dosis (10 mg/kg), aunque en bajas dosis aumenta el desempeño cognitivo, aunque son discutibles sus efectos por acción aguda o crónica. En este trabajo, fue administrado MPH en tres dosis crónicas (0,20 – 1,0 – 5,0 mg/kg i.p.) a ratas macho jóvenes Sprague Dawley (130 - 150 g), durante 15 sesiones. Los animales fueron evaluados individualmente en el laberinto radial octogonal de Olton 4 x 4 para examinar el rendimiento visuoespacial referido a memoria de corto y largo plazo. La rata consume un refuerzo dispuesto en cada brazo del laberinto. Primero cumple la tarea en 4 brazos. Los demás son desbloqueados, una vez consumido la totalidad del refuerzo. Se considera error cuando ingresa a un brazo donde previamente consumió un refuerzo. Una vez concluida esta etapa, a las ratas que recibieron 1.0 mg/kg, les fue aplicado un protocolo de medición de potenciación de largo plazo (LTP) *in vivo* en corteza prefrontal evocada por tetanización. Los resultados obtenidos muestran que MPH 5 mg/kg deteriora el desempeño de corto y largo plazo, en la etapa de adquisición de aprendizaje, mientras que 0.2 y 1.0 mg/kg no alteran el desempeño. Resultados preliminares muestran un incremento significativo de la LTP en ratas con 1.0 mg/kg. Estos resultados sugieren que bajas dosis de MPH no alterarían los sistemas de neurotransmisión involucrados en tareas de memoria visuoespacial de corto y largo plazo, aunque las dosis altas, sí generarían deterioro. El incremento de la LTP en ratas con 1.0 mg/kg de MPH podría evidenciar cambios neuroplásticos inducidos por la activación de los mecanismos de neurotransmisión dopaminérgica y/o noradrenérgica a nivel de la corteza prefrontal.

Agradecimientos: Proyectos FONDECYT 1120580, DICYT-USACH 020593Z y 021001SB.

Correo electrónico: hector.burgos@usach.cl

P010. ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA DE EPOH RECOMBINANTE EN CONDICIONES DE POST-TRATAMIENTO EN UN MODELO DE CÉLULAS PC-12 BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS OXIDATIVO (Post-treatment neuroprotective activity of recombinant hEPO in PC-12 cells under oxidative stress).

Sotomayor, K.¹, Zaror S.¹, González M.¹, Jiménez S.P.¹, Castillo C.², Araya J.², Fuentealba J.², Sánchez O.³, Toledo J.R.¹

¹Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, Departamento de Fisiopatología. ²Laboratorio de Screening de Compuestos Neuroactivos, Departamento de Fisiología ³Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción.

Los accidentes cerebrovasculares (ACV) constituyen un problema de alto impacto para la salud mundial. Actualmente la OMS publicó que las ACVs son la tercera causa de muerte a nivel mundial, con una incidencia que se incrementa con factores de riesgo como la obesidad, la hipertensión, el tabaquismo y la edad. Sin embargo, no se dispone de tratamientos efectivos para disminuir el daño producido por la condición isquémica en un cuadro de ACV. Recientemente se han identificado efectos pleiotrópicos en la hormona glicoproteica eritropoyetina humana (EPOh), no relacionados con su capacidad hematopoyética. Entre ellos su actividad anti-apoptótica en células neuronales, mediante su unión al receptor expresado en distintos tipos celulares que componen el sistema nervioso. En el presente trabajo se evaluó la actividad neuroprotectora de una variante recombinante de la EPOh en un modelo de células PC-12 en condiciones de estrés oxidativo inducido con H₂O₂. Se simuló condiciones de post-tratamiento administrando EPOh a los cultivos en diferentes tiempos, posteriores a la inducción de las condiciones de citotoxicidad. Se determinó que, independientemente efecto citotóxico del cultivo celular por el tiempo de exposición a H₂O₂, la administración de EPOh disminuye de forma proporcional y significativa el daño oxidativo en los cultivos de células PC-12. Adicionalmente, se determinó que el efecto protector de la EPOh en los cultivos celulares está directamente relacionado con la activación de la vía de señalización JAK-2. Nuestros resultados muestran el potencial neuroprotector de la EPOh recombinante, con aplicación terapéutica en la atenuación del daño neuronal producido durante un ACV.

Agradecimientos: Proyecto Fondecyt Postdoctorado 2013, código 3130705

Correo electrónico: ksotomay@udec.cl

Socio Patrocinante: Fuentealba, J.

P011. LA EXPOSICIÓN NEONATAL A TESTOSTERONA AUMENTA EL CONTENIDO DE DOPAMINA EN SUSTANCIA NIGRA-ÁREA TEGMENTAL VENTRAL DE LA RATA MACHO ADULTA. POSIBLE ROL DE LA AROMATIZACIÓN CEREBRAL A ESTRADIOL (Neonatal exposure to testosterone increases dopamine content in substantia nigra-ventral tegmental area in adult male rat. Possible role of brain aromatization to estradiol).

Espinosa, P.¹; Riquelme, R.¹; Silva, R.¹; Cruz, G.¹; Dagnino-Subiabre, A.¹; Renard, G.M.¹; Sotomayor-Zárate, R.^{1,2}

¹Centro de Neurobiología y Plasticidad Cerebral, Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile. ²Núcleo Milenio Estrés y Adicción (NEDA), Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

El concepto de *programming* fue definido como la redirección fisiológica de un órgano o tejido por efecto de un estímulo o daño en un periodo sensible del desarrollo. En este sentido, el propósito de este trabajo fue determinar los cambios inducidos por la administración neonatal de testosterona propionato (TP) y dihidrotestosterona (DHT) en el contenido de dopamina (DA) de la Sustancia Nigra (SN)-Área tegmental ventral (VTA) a los 60 días de vida posnatal (PND60).

En este estudio, se utilizaron ratas Sprague-Dawley de ambos sexos divididas en grupos tratamiento TP (1.0 mg/50µL s.c.), DHT (1.0 mg/50µL s.c.) y control (aceite 50µL s.c.). Al PND60, SN-VTA y estriado fueron microdisectados. Los tejidos cerebrales fueron pesados, homogenizados, centrifugados e inyectados en un HPLC acoplado a detección electroquímica para la determinación del contenido de DA.

Nuestros resultados muestran que la administración neonatal de TP produce un aumento significativo en el contenido de DA en SN-VTA de ratas machos adultos. Sin embargo, la administración neonatal de DHT no afecta el contenido de DA en la misma región cerebral. Posiblemente, el efecto observado por la administración neonatal de TP en ratas machos se deba a la aromatización cerebral a estradiol (ver poster Riquelme, R.). Interesantemente, la administración neonatal de TP y DHT en hembras produce un efecto opuesto al observado en machos, ya que la administración neonatal de DHT produce una disminución significativa del contenido de DA en SN-VTA al PND60, mientras que la administración neonatal de TP no afecta el contenido de DA en la misma región cerebral.

Nuestros resultados muestran que la administración neonatal de andrógenos afectan el contenido de DA en SN-VTA de ratas adultas. Posiblemente los efectos de la administración neonatal de TP en machos, a través de su aromatización a estradiol, afecte la expresión de la tirosina hidroxilasa, enzima limitante de la síntesis de DA.

Agradecimientos: Financiado por ICM N° P10/063-F y Proyecto FONDECYT N° 111-21205.

Correo electrónico: ramon.sotomayor@uv.cl

Socio Patrocinante: Sotomayor-Zárate, R.

P012. LA EXPOSICIÓN NEONATAL A VALERATO DE ESTRADIOL AUMENTA EL CONTENIDO DE DOPAMINA EN LA VÍA NIGROESTRIAL Y DISMINUYE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA INDUCIDA POR ANFETAMINA EN LA RATA ADULTA (Neonatal exposure to estradiol valerate increases dopamine content in nigrostriatal pathway and decreases locomotor activity induced by amphetamine during adulthood in the rat).

Riquelme, R.¹; Espinosa, P.¹; Silva, R.¹; Cruz, G.¹; Dagnino-Subiabre, A.¹; Renard, G.M.¹; Sotomayor-Zárate, R.^{1,2}

¹Centro de Neurobiología y Plasticidad Cerebral, Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile. ²Núcleo Milenio Estrés y Adicción (NEDA), Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

Las ventanas específicas de sensibilidad corresponden a periodos tempranos del desarrollo (prenatal o neonatal) en donde ciertos estímulos pueden generar efectos a largo plazo. En este sentido, el propósito de este trabajo fue determinar cambios inducidos por la administración neonatal de valerato de estradiol (EV) en el contenido de dopamina (DA) y noradrenalina (NA) de la vía nigroestriatal de la rata adulta. La vía nigroestriatal ha sido elegida por su rol en los efectos neuroquímicos de todas las drogas de abuso utilizadas por los seres humanos.

En este estudio, se utilizaron ratas Sprague-Dawley de ambos sexos divididas en grupos tratamiento EV (0.1 mg/50µL s.c. por rata) y control (corn oil 50µL s.c. por rata). A los 60 días de edad la sustancia nigra (SN), área tegmental ventral (VTA) y estriado fueron microdisectados. Los tejidos cerebrales fueron pesados, homogenizados, centrifugados (4°C) e inyectados en un HPLC acoplado a detección electroquímica para la determinación del contenido de DA y NA. En otro grupo de ratas tratamiento y control se midió la actividad locomotora basal e inducida por amfetamina (1.0 mg/Kg i.p. por rata).

Nuestros resultados muestran que la administración neonatal de EV produce un aumento significativo en el contenido de DA en SN-VTA y estriado de ratas hembras adultas. Mientras que el contenido de NA solo aumento en estriado. Por otro lado, observamos que la administración neonatal de EV en ratas machos no afecta el contenido de catecolaminas en SN-VTA y estriado de ratas machos adultas. Los experimentos conductuales demostraron que amfetamina induce un aumento en la actividad locomotora en los grupos control de ambos sexos y en machos tratados con EV. Sin embargo, en ratas hembras tratadas con EV la amfetamina no produce un incremento de la actividad locomotora. Nuestros resultados muestran que la administración neonatal de EV modifica en contenido de DA en la vía nigroestriatal de ratas hembras adultas. Posiblemente los efectos de la administración neonatal de EV afecta la expresión de proteínas claves en la neurotransmisión dopaminérgica, como tirosina hidroxilasa y el transportador de DA.

Agradecimientos: Financiado por ICM N° P10/063-F y Proyecto FONDECYT N° 111-21205.

Correo electrónico: ramon.sotomayor@uv.cl

Patrocinante: Sotomayor-Zárate, R.

P013. ACCIÓN NEUROPROTECTORA DE LA CURCUMINA: UNA ALTERNATIVA DE APOYO EN EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

Morales, I.¹, Cerda C.¹ y Maccioni R.B.¹

¹ Laboratorio de Biología Celular, Molecular y Neurociencias, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile y Centro Internacional de Biomedicina (ICC).

En la actualidad cada vez se realizan más estudios en la búsqueda de agentes antioxidantes y antiinflamatorios naturales como alternativa a los tratamientos de la enfermedad de Alzheimer (EA). Así, investigaciones realizadas con extractos de curcumina llaman la atención por sus positivos efectos en pacientes con la EA. Se ha postulado que esto se debe a sus propiedades antioxidantes, su capacidad de restauración de suministro sanguíneo al cerebro, reduciendo el estrés oxidativo y la mejora de la función colinérgica del cerebro. Sin embargo, no se ha probado experimentalmente tal capacidad y se desconoce el mecanismo biológico por el cual se logran estos efectos.

En este contexto, nuestra investigación se desarrolló en el marco de la búsqueda de los mecanismos asociados a este fenómeno de neuroprotección de la curcumina en modelos celulares de cultivo *in vitro* (neuroblastomas N2a y SH-S5SY), los cuales fueron sometidos a condiciones de estrés en presencia y ausencia de éste agente natural. Nuestros resultados aportan evidencia que la curcumina fue capaz de proteger a las células N2a y SH-S5SY de la toxicidad por H₂O₂ y por glutamato, sugiriendo que la capacidad antioxidante y redox de la curcumina estaría involucrada en su mecanismo de acción, favoreciendo la supervivencia de las células en estudio. Adicionalmente, se realizaron análisis de los cambios morfológicos en estas células en condiciones de estrés y en presencia de curcumina, los que den cuenta del efecto de la curcumina en la maduración y desarrollo celular.

Agradecimientos: Financiado por Fondecyt 11100373 e INNOVA Corfo 12IDL4-13071.

Correo electrónico: inelia.morales@gmail.com

P014. EL BLOQUEO FARMACOLÓGICO DE PANEXINA 1 MODIFICA LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR DE NMDA Y DE LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS DURANTE EL DOLOR NEUROPÁTICO EN RATAS (Pharmacological blockage of pannexin 1 modifies the activity of NMDA receptor and purinergic receptors during neuropathic pain in rats).

Bravo, D.¹, Pelissier T.², Hernández A.¹, Laurido C.¹, Constandil L.¹

¹. Laboratorio de Neurobiología, Dpto. de Biología, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile. ². ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Panexina es un canal de membrana, expresado en neuronas y astrocitos del sistema nervioso central (SNC), en diversos mamíferos. Este canal es activado por voltaje, calcio intracelular, potasio extracelular elevado y ATP. Panexina 1 ha sido descrito como un participante crucial en diversas patologías donde se observa hiperexcitabilidad neuronal y glial, como en epilepsia, isquemia y procesos neuroinflamatorios. Particularmente interesante es la relación de este canal con los receptores purinérgicos y el receptor de NMDA, dado que ambos han sido descritos como fundamentales en el dolor crónico y, recientemente, hemos descrito la participación de Panexina 1 en el dolor neuropático. Sin embargo, no está clara su relación con estos receptores durante el dolor crónico. Por lo tanto, nuestro objetivo fue describir la interacción entre panexina 1 y estos receptores. Mediante un modelo de dolor neuropático en ratas, se estudiaron variaciones en el wind up espinal, un indicador funcional de la actividad del receptor de NMDA, *in vivo*, luego de una inyección intratecal (ITI) de 10panx, un péptido inhibidor de Panexina 1. Adicionalmente, se testeó la interacción vía ITI de BzATP, un activador de la señalización purinérgica, con 10panx, utilizando el mismo protocolo. Se observó una disminución en más del 50% en el wind up espinal, al bloquear a Panexina 1, lo cual sugiere fuertemente una interacción entre NMDA y Panexina 1. Además, se observó que la administración de BzATP produce una hiperexcitabilidad espinal, pero la aplicación simultánea de 10panx suprime este efecto. Por lo tanto, el bloqueo farmacológico de panexina 1 modifica la actividad tanto de NMDA como de la señalización purinérgica, sugiriendo fuertemente que este canal interactúa con ambos receptores, en condiciones de dolor neuropático.

P015. METAMIZOL ASOCIADO A METADONA EN DOSIS UNICA PRODUCE SINERGIA Y A DOSIS REPETIDAS ANTAGONISMO EN EL TEST DE FORMALINA INTRAPLANTAR EN EL RATÓN (One dose of metamizol associated to methadone produces synergy while repetitive doses produce antagonism in the intraplantar formalin test in mice).

Cazanga, V.¹, López J.¹, Constandil L.², Hernández A.² y Kramer V.³, Pelissier T.¹.

¹Prog. Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile; ²Laboratorio de Neurobiología, Facultad de Química Biología, Universidad de Santiago de Chile; y ³Unidad de Cuidados Paliativos, Instituto Nacional del Cáncer.

Se ha descrito una disminución significativa de las concentraciones plasmáticas de ciclosporina y bupropion en voluntarios sanos que han recibido previamente administración repetida de metamizol. El mecanismo potencial de esta disminución sería inducción enzimática de la CYP 2B6 causada por metamizol. Ya que metadona es metabolizada por CYP 2B6, investigamos si la administración de metamizol afecta la acción antinociceptiva de metadona. Se utilizó el test de formalina (2%, 20 µL) intraplantar en ratones CF1 y se evaluó como conducta nociceptiva el frotamiento y "gratage" de la zona inyectada durante 45 minutos. Tanto metamizol (3, 10, 30 y 100 mg/kg s.c.) como metadona (0.3, 1, 3 y 10 mg/kg s.c.) produjeron un efecto antinociceptivo (EA) dosis-dependiente, obteniéndose una DE₅₀ de 25.59 mg/Kg y 2.88 mg/Kg respectivamente. La interacción entre estos dos fármacos se estudió utilizando proporciones equiefectivas de cada DE₅₀ administradas simultáneamente. Con los resultados se construyó un isoblograma, que mostró un efecto supraaditivo (índice de interacción: 0.636). En una segunda etapa, en base a la DE₅₀ obtenida para la combinación, se administró la proporción respectiva de cada fármaco (metamizol, 8.14 mg/kg; metadona, 0.92 mg/kg) en forma (a) simultanea, y (b) metamizol precediendo a metadona. Los resultados mostraron una sinergia cuando ambos fármacos se administraron simultáneamente (EA = 49.2%), y un antagonismo cuando metamizol precedió a metadona en dosis repetidas (cada 6 horas) durante un día (EA = 22.3%) o durante dos días (EA = -30.5%). Se sugiere que la administración repetida de metamizol podría disminuir la eficacia de metadona en clínica.

Agradecimientos: Proyecto Fondecyt 1120952.

P016. PARTICIPACIÓN DE BDNF Y LAS CÉLULAS GLIALES EN LA INICIACIÓN DEL DOLOR CRÓNICO EN UN NUEVO MODELO INDUCIDO POR ESTÍMULOS ELÉCTRICOS DE ALTA FRECUENCIA Y AUSENCIA DE LESIÓN EN RATAS (Participation of BDNF and glial cells in the initiation of the chronic pain in a new model induces of high frequency electric stimulus and lack of injury in rats).

Retamal, J.^{1,2}, Reyes A.¹, Ibarra P.^{1,2}, Pelissier T.³, Laurido C.¹, Hernández A.¹, Constandil L.^{1,2}.

¹Laboratorio de Neurobiología, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile. ²Center for Integrative Medicine and Innovative Science, Facultad de Medicina, Universidad Andrés Bello. ³Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El dolor crónico se caracteriza por cambios plásticos en las redes neurales lo cual se relaciona con la disminución del umbral nociceptivo. Varios modelos animales se han utilizado para estudiar dichos cambios, sin embargo todos los modelos utilizados hasta la fecha (mononeuropáticos y monoartríticos) generan lesiones periféricas, enmascarando los procesos involucrados en el inicio del dolor crónico.

Nuestro objetivo fue estudiar la participación de BDNF y de las células gliales en el inicio del dolor crónico, en un nuevo modelo de dolor animal producido por estímulos eléctricos subcutáneos de alta frecuencia (ESAF) en la pata trasera, los cuales no producen una lesión periférica a simple vista y no modifican los patrones motores de la rata.

La generación del modelo se realizó en ratas anestesiadas (isoflurano) sometidas a estímulos ESAF (trenes de 1s duración, compuesto por pulsos eléctricos de 120V, 3ms a 100Hz) repetido con intervalo de 10min y aplicados en electrodos insertos subcutáneamente en los dedos de la pata.

La instauración del dolor crónico se evaluó con el test de Randall Selitto el cual determina los umbrales nociceptivos. Los animales estimulados con ESAF mostraron una disminución significativa del 30% en el umbral nociceptivo 1 h después de la estimulación y se mantuvieron reducidos hasta el día 21. La utilización de ciclotraxina-B (CTX-B) un bloqueador del receptor de BDNF y pentoxifilina (PTX) un inhibidor glial, administrado de forma previa y posterior a la estimulación ESAF, inhibió o revertió la hiperalgesia generada por la estimulación ESAF respectivamente. Estos datos indican que el receptor de BDNF y las células gliales son cruciales en el inicio de la generación de los cuadros de dolor crónico.

Agradecimientos: Proyecto FONDECYT 1120952. CEDENNA: FB807

Correo electrónico: Jeffri.retamal@usach.cl

Socio Patrocinante: Pelissier, T.

P017. ANALISIS ISOBOLOGRAFICO DE LA INTERACCION OPIOIDE-OPIOIDE EN UN MODELO DE DOLOR NOCICEPTIVO EN RATON.

Lux, S.¹; Lobos N.¹, Prieto J.C.^{1,2}, Noriega V.², Zepeda R.¹, Miranda H.F.¹

¹Programa de Farmacología, ICBM, Facultad de medicina, Universidad de Chile, Independencia 1027, Santiago, Chile.

²Departamento de Cardiología, Hospital Clínico de la Universidad de Chile, Universidad de Chile, Santos Dumont 999, Santiago, Chile.

Los opioides han sido usados por un largo tiempo en el manejo del dolor y se sabe que su coadministración puede inducir sinergismo. La interacción antinociceptiva entre fentanil, metadona, morfina y tramadol fue evaluada en el writhing test (contracción abdominal producida por ácido acético) en ratón. La ED₅₀ (dosis que produce el 50% de antinocicepción) fue calculada a través del logaritmo de la curva de dosis respuesta a una razón fija de seis combinaciones de opioides. La coadministración de estos fármacos resultó en una antinocicepción sinérgica con un índice de interacción entre 0.226 (morfina/metadona) y 0.522 (fentanil/tramadol). La combinación opioide-opioide puede ser útil en el tratamiento del dolor, dado que cada fármaco entrega un diferente perfil de actividad y la coadministración podría reducir la dosis de cada uno con la ventaja de generar menor cantidad de efectos adversos, menor dependencia, tolerancia y mejor tolerabilidad.

Correo electrónico: hmiranda@med.uchile.cl

Socio Patrocinante: Zepeda, R.

P018. MODULACION NITRIDERGICA DE LA ACTIVIDAD ANTINOCICEPTIVA DE ROSUVASTATINA EN RATONES (Nitridergic modulation of antinociceptive activity of rosuvastatin in mice).

Lobos, N.¹; Lux S.¹, Prieto J.C.^{1,2}, Noriega V.², Zepeda R.¹, Miranda H.F.¹

¹Programa de Farmacología, ICBM, Facultad de medicina, Universidad de Chile, Independencia 1027, Santiago, Chile.

²Departamento de Cardiología, Hospital Clínico de la Universidad de Chile, Universidad de Chile, Santos Dumont 999, Santiago, Chile.

Las estatinas, inhibidores de la 3-hidroxi-3 metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa, son fármacos hipolipemiantes que se usan frecuentemente en enfermedades cardiovasculares como la hiperlipidemia y aterosclerosis. Se ha observado que las estatinas tienen un efecto antiinflamatorio independiente de sus efectos hipolipemiantes y este efecto antiinflamatorio inhibe la inflamación y el dolor. Este estudio evaluó el efecto antinociceptivo y antiinflamatorio de rosuvastatina usando los ensayos contorsiones con ácido acético, formalina en pata trasera, formalina orofacial y test de plancha caliente. Los siguientes grupos experimentales fueron usados: control, agudo (1 día) y crónico (3 días) luego de administración orogástrica de rosuvastatina (3, 10, 30, 100, 300 mg/kg). La administración de rosuvastatina produjo una antinocicepción dosis dependiente, con diferente potencia, en todos los ensayos. Adicionalmente, el inhibidor no selectivo de la óxido nítrico sintasa (L-NAME) fue usado para evaluar la participación del óxido nítrico en esta antinocicepción inducida por rosuvastatina. Los resultados demostraron la actividad antinociceptiva y anti-inflamatoria de rosuvastatina en modelos algesiométricos de dolor tónico o fásico. Más aún, estas actividades parecen ser moduladas por óxido nítrico. Estos resultados podrían ser relevantes en el tratamiento farmacológico del dolor en humanos donde rosuvastatina y L-NAME debiesen ser usados.

Agradecimientos: Programa U-INICIA 560754

Correo electrónico: nicolasyac@gmail.com

Socio Patrocinante: Zepeda, R.

P019. ESTUDIO COMPARATIVO DE PARÁMETROS ELECTROCARDIOGRÁFICOS Y ELECTROLITOS PLASMÁTICOS EN MODELO PORCINO (SUS SCROFA DOMESTICA) SOMETIDOS A ANESTESIA PROPOFOL/REMIFENTANILO CON Y SIN ADMINISTRACIÓN AGUDA DE ALCOHOL (Comparative study of electrocardiographic parameters and plasma electrolytes in porcine model (*Sus scrofa domestica*) undergoing anesthesia propofol / remifentanyl with and without acute alcohol administration).

Montero, E.¹, Salgado, M^a F.¹, Avendaño, C.¹, Contreras, E.², Sepúlveda, M^aJ.³

¹Facultad Medicina Veterinaria. Universidad San Sebastián. Concepción. Chile. ²Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción. Concepción. Chile. ³Facultad de Medicina. Universidad U.S.C.S. Concepción. Chile.

Los siniestros automovilísticos producidos por causa del alcohol y las severas lesiones que ellos producen son cada vez más frecuentes. Muchos de estos pacientes ingresan a los servicios de urgencia con alcoholemia positiva enfrentando la cirugía sin un protocolo anestésico establecido para estos casos. Es por ello, que se realizó un estudio clínico controlado bajo la administración de anestesia total intravenosa propofol/remifentanilo (TIVA P/R) en modelo porcino con el objeto de determinar si los parámetros electrocardiográficos y electrolitos séricos se modifican por acción del alcohol.

Se emplearon 9 cerdos, raza Landrace-Largewhite, ASA 1, de edad y peso promedios, 2,5 meses y 13 kg, respectivamente. Los animales fueron pre-medicados con Ketamina y Diazepam. El estudio se realizó en los mismos animales y en dos períodos anestésicos similares. (40 min.) En el primer período se sometió a inducción anestésica con un bolo de propofol 1% 1mg.Kg⁻¹ y dosis de mantención: propofol 11mg.Kg⁻¹.hra⁻¹ y remifentanilo 0,5ug. Kg⁻¹.hra⁻¹. En el segundo período, luego de un wash-out de 3 días, se administró el mismo protocolo anestésico del 1^{er} tiempo del estudio con una administración de alcohol 96º diluido al 50% y una dosis 125 mg.kg⁻¹. En ambos períodos anestésicos se determinaron los parámetros electrocardiográficos y electrolitos séricos. En el minuto 0, 20 y 40 del estudio se registró la frecuencia cardiaca, complejo QRS, intervalos PR, QT, QT_c y segmento ST. Además, se registraron los electrolitos plasmáticos: sodio, potasio, cloruro y bicarbonato. La data fue expresada en valores promedio y error estándar siendo sometida a test de Student.

Durante la administración de TIVA P/R con alcohol se observó disminución significativa de la frecuencia cardiaca (0 y 20 min.) cloruro y potasio, (20min.) respecto de la misma administración sin alcohol. El resto de los parámetros electrocardiográficos y electrolitos estudiados no presentaron diferencias significativas entre ambos períodos anestésicos.

Agradecimientos: Proyecto USS2011-00007-R

Correo electrónico: edson.montero@uss.cl

P020. ESTUDIO COMPARATIVO DE PARÁMETROS CARDIOVASCULARES Y GASOMETRÍA ARTERIAL EN MODELO PORCINO (SUS SCROFA DOMESTICA) SOMETIDOS A ANESTESIA INHALATORIA SEVOFLUORANO/OXIGENO CON Y SIN ADMINISTRACIÓN AGUDA DE ALCOHOL (Comparative study of cardiovascular parameters and arterial blood gases in porcine model (*Sus scrofa domestica*) undergoing anesthesia sevoflurane/oxygen with and without acute alcohol administration).

Montero, E.¹, Brevis, F.¹, Avendaño, C.¹, Contreras, E.², Sepúlveda, M^aJ.³

¹Facultad Medicina Veterinaria. Universidad San Sebastián. Concepción. Chile. ²Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción. Concepción. Chile. ³Facultad de Medicina. Universidad U.S.C.S. Concepción. Chile.

En Chile, el binomio alcohol-conducción es la segunda causa de muerte en jóvenes entre 15-29 años de edad, el número de lesionados que necesitan cirugías de urgencia ha ido en aumento y complejidad. Muchos de estos pacientes ingresan con una ingesta aguda de alcohol a los servicios de urgencia sin tener un protocolo anestésico debidamente estudiado. Es por ello, que se realizó un estudio clínico controlado en un modelo porcino con el objeto de determinar si los parámetros cardiovasculares y gasométricos se modifican por acción del alcohol.

Se emplearon 9 cerdos, raza Landrace-Largewhite, ASA 1, de edad y peso promedios, 2,5 meses y 13 kg, respectivamente. Los animales fueron pre-medicados con Ketamina y Diazepam. El estudio se desarrolló en dos períodos anestésicos similares (40 min.) con Anestesia Inhalatoria (VIMA) en los mismos animales. En el primer período se sometió a inducción anestésica con la asociación sevoflurano 6% y Oxígeno 2,5 L.min⁻¹ (S/O) con ventilación espontánea (Matrx) a 10 mmH₂O por 3 min para luego seguir con dosis de mantención: S/O (2%; 2,5L.min⁻¹). En el segundo período, luego de un wash-out de 3 días, se administró VIMA S/O asociado con alcohol 96º diluido al 50% y una dosis 125 mg.kg⁻¹. Se registraron las presiones arteriales sistólica, diastólica y media, frecuencia cardiaca y temperatura, cada 5 min. Se tomaron muestras de sangre arterial en el minuto 0, 20 y 40 min. para exámenes gasométricos. La data fue expresada en valores promedio y error estándar siendo sometida a test de Student.

Se observó una disminución significativa de la frecuencia cardiaca, temperatura y presión parcial O₂ (PaO₂) durante la administración de VIMA S/O con alcohol. En este mismo período aumento significativamente la presión arterial sistólica y media, PaCO₂, y los tiempos de inducción y recuperación anestésica. El resto de los parámetros no presentaron diferencias.

Agradecimientos: Proyecto USS2011-00007-R

Correo electrónico: edson.montero@uss.cl

P021. ESTUDIO COMPARATIVO DE PARÁMETROS ELECTROCARDIOGRÁFICOS Y ELECTROLITOS PLASMÁTICOS EN MODELO PORCINO (SUS SCROFA DOMESTICA) SOMETIDOS A ANESTESIA INHALATORIA SEVOFLUORANO/OXIGENO CON Y SIN ADMINISTRACIÓN AGUDA DE ALCOHOL (Comparative study of electrocardiographic parameters and plasma electrolytes in porcine model (*Sus scrofa domestica*) undergoing anesthesia sevoflurane/oxygen with and without acute alcohol administration).

Montero, E.¹, Rivas, Z.¹, Avendaño, C.¹, Contreras, E.², Sepúlveda, M.³.

¹Facultad Medicina Veterinaria. Universidad San Sebastián. Concepción. Chile. ²Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción. Concepción. Chile. ³Facultad de Medicina. Universidad U.S.C.S. Concepción. Chile.

Los accidentes automovilísticos producidos por causa del alcohol y las severas lesiones que ellos producen son cada vez más frecuentes. Muchos de estos pacientes ingresan a los servicios de urgencia con alcoholemia positiva para enfrentar una cirugía sin un protocolo anestésico establecido para estos casos. Es por ello, que se realizó un estudio clínico controlado en un modelo porcino con el objeto de determinar si los parámetros cardiovasculares y gasométricos se modifican por acción del alcohol.

Se emplearon 9 cerdos, raza Landrace-Largewhite, ASA 1, de edad y peso promedios, 2,5 meses y 13 kg, respectivamente. Los animales fueron pre-medicados con Ketamina y Diazepam. El estudio se desarrolló en dos periodos anestésicos similares (40 min.) con anestesia inhalatoria (VIMA) en los mismos animales. En el primer periodo se sometió a inducción anestésica con la asociación sevoflurano 6% y Oxígeno 2,5 L.min⁻¹ (S/O) con ventilación espontánea (Matrx) a 10 mmH₂O por 3 min para luego seguir con dosis de mantención: S/O (2%; 2,5L.min⁻¹). En el segundo periodo, luego de un wash-out de 3 días, se administró VIMA S/O asociado con alcohol 96º diluido al 50% con dosis de 125 mg.kg⁻¹. En ambos periodos anestésicos se determinaron los parámetros electrocardiográficos y electrolitos séricos. En el minuto 0, 20 y 40 del estudio se registró la frecuencia cardíaca, complejo QRS, intervalos PR, QT, QT_c y segmento ST. Además, se registraron los electrolitos plasmáticos: sodio, potasio, cloruro y bicarbonato. La data fue expresada en valores promedio y error estándar siendo sometida a test de Student.

Durante la administración de VIMA S/O con alcohol se observó una disminución de las concentraciones plasmáticas de potasio y un aumento de la duración del complejo QRS. (20 y 40 min.) El resto de los parámetros electrocardiográficos y electrolitos plasmáticos no mostraron diferencias entre ambos periodos anestésicos.

Agradecimientos: Proyecto USS2011-00007-R

Correo electrónico: edson.montero@uss.cl

P022. ESTUDIO DE CATIONES LIPOFÍLICOS DESLOCALIZADOS DERIVADOS DE ÁCIDO GÁLICO COMO AGENTES CITOTÓXICOS EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA HUMANAS. (Study of delocalized lipophilic cation of gallic acid derivatives as cytotoxic agents in human mammary cancer cells).

Fuentes-Retamal, S.^{1,2}; Guzmán-Rivera D.^{1,2}; Jara J.¹; Bugueño-Valenzuela M.¹; Caballero-Pohl M.¹; Castro-Castillo V.³; Madrid-Rojas M.³; Ferreira J.¹.

¹Laboratorio de Metabolismo Energético y Cáncer, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. ²Departamento de Química Orgánica y Físicoquímica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. ³Laboratorio de Química Experimental, Departamento de Química, UMCE.

Según el Ministerio de Salud, el 25% de las muertes anuales en mujeres se debe a algún tipo de tumor maligno, de este porcentaje el cáncer de mama es el responsable de un 12%. A pesar de los avances en la farmacoterapia en este ámbito, las células tumorales muestran resistencia a la acción de quimioterápicos, por ello se hace interesante la búsqueda e investigación de nuevas herramientas terapéuticas que permitan aumentar la eficacia y selectividad de los tratamientos.

El ácido gálico es un polihidroxifenol presente en una amplia variedad de plantas, tanto en forma libre o como constituyente de taninos. Presenta actividad antibacteriana, antiviral, antiinflamatoria, antioxidante, protector cardiovascular, inhibidor de la fosforilación oxidativa y antitumoral. Dado que es un compuesto antitumoral con acción mitocondrial, al agregar un grupo químico que lo conduzca a este organelo, mejorará su entrega y por lo tanto su acción. Esto se produce por la incorporación del grupo trifenilfosfonio, generando un catión lipofílico deslocalizado, que es capaz de dirigirse selectivamente hacia la membrana interna mitocondrial debido a la carga negativa que posee. Tal efecto es incrementado en células tumorales, pues se ha comprobado que existe una diferencia de potencial de transmembrana mitocondrial mayor que en sus pares normales. Los compuestos estudiados en distintas líneas celulares mamarias humanas corresponden a derivados de varios mono- y polihidroxifenoles en que se ha incorporado este grupo trifenilfosfonio mediante una cadena lateral saturada de diez carbonos. Presentan un IC₅₀ en la escala sub-micromolar, con una selectividad relevante con respecto a células normales. Ejercen una acción desacoplante de la fosforilación oxidativa, disminuyendo los niveles de ATP. Además, se observa la exposición de fosfatidilserina, sugiriendo una muerte de tipo apoptótica. Por lo que estos compuestos son buenos candidatos para ser ensayados *in vivo*.

Agradecimientos: Proyecto FONDECYT 1130772.

Correo electrónico: sebastianfuentesr@gmail.com

Socio Patrocinante: Ferreira J.

P023. 6-(4-METIL-PENT-3-ENIL)-[1,4] NAFTOQUINONA INDUCE EFECTOS ANTIPROLIFERATIVOS MEDIADOS POR LA PRODUCCIÓN DE ROS EN CELULAS DE CANCER MAMARIO (6-(4-methyl-pent-3-enyl)-[1,4]naftoquinone induces antiproliferative effects in breast cancer cells by ROS production).

Guzmán-Rivera, D.^{1,2}, Fuentes-Retamal S.^{1,2}, Urra FA.^{1,2}, Jara J.², Ferreira J.² y Araya-Maturana R.¹.

¹Departamento de Química Orgánica y Fisicoquímica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. ²Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Programa de Farmacología Molecular y Clínica. Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La mitocondria es un organelo que juega un papel crucial en el metabolismo y la regulación de la muerte celular. Por otra parte se ha descrito que las células tumorales presentan alteraciones en la bioenergética mitocondrial que favorecen la resistencia a la muerte celular. En este contexto, aquellos compuestos que afecten esta vía pueden ofrecer un atractivo blanco para el diseño de agentes anti-tumorales. 6-(4-metil-pent-3-enil)-[1,4] naftoquinona (MPENQ), es un compuesto cuyos efectos antiproliferativos sobre células tumorales han sido reportados, sin entenderse los mecanismos involucrados en su acción. En este trabajo, se presenta evidencia de que la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) contribuye a su acción antiproliferativa frente a células de cáncer de mama humano MCF7 y su variante metastásica MDA-MB-231 con valores de IC₅₀ de 17.82 μ M y 11.8 μ M, respectivamente.

Como una de las principales fuentes generadoras de ROS es la mitocondria, se usaron mitocondrias aisladas desde células de adenocarcinoma mamario TA3, para evaluar el efecto de MPENQ sobre el consumo de oxígeno (OCR). Además, se evaluaron los efectos de MPENQ sobre parámetros bioenergéticos tales como niveles intracelulares de ATP, NADH y ROS en células intactas, encontrando que esta quinona incrementa el OCR, lo cual es revertido parcialmente por la inhibición de los complejos respiratorios I, III, y IV, mediante la incubación con rotenona, antimicina-A y KCN, respectivamente; sugiriendo la participación de la cadena transportadora de electrones mitocondrial en la producción de ROS. Además, la incubación con N-acetil cisteína por 48h previno el efecto antiproliferativo de MPENQ, contrario al efecto de la combinación con el antioxidante Trolox®, indicando que el glutatión es afectado por MPENQ.

Estos datos sugieren que el efecto de MPENQ sobre células de cáncer de mama está mediado por la generación de ROS.

Agradecimientos: Proyectos FONDECYT No.1110176 (RAM), 1130772 (JF) y Anillo ACT-1107 (RAM).

P024. ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE CATIONES LIPOFILICOS DESLOCALIZADOS DERIVADOS DE ÁCIDO GÁLICO EN UN MODELO MURINO SINGÉNICO (Antitumoral activity of delocalized lipophilic cations-gallic acid derivatives in a syngeneic mouse model).

Peredo, L.¹, Jara J.¹, Castro V.², Saavedra J.², Kemmerling U.³, Ferreira J.¹

¹Laboratorio de Metabolismo Energético y Cáncer, Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. ²Laboratorio de Química Experimental, Departamento de Química, UMCE. ³Laboratorio de Mecanismos de Infección Parasitaria, Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La terapia antineoplásica actual a menudo lleva a la obtención de resultados deficientes debido a la aparición de resistencia a los agentes quimioterapéuticos utilizados. Es por esto que se ha puesto énfasis en la búsqueda de nuevos blancos farmacológicos. La mitocondria ha resultado ser de gran interés, debido a las diferencias que ella presenta en las células tumorales respecto a las normales: disminución en la masa mitocondrial, aumento del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), entre otras. Más aún, la mitocondria juega un rol clave en el metabolismo energético celular, los niveles de Ca²⁺ citosólico, la producción de ROS, apoptosis y necrosis. De esta manera, la administración de fármacos con especificidad mitocondrial podría contribuir a la implementación de nuevos tratamientos complementarios. El ácido gálico (AG) es un compuesto de origen natural, que ha sido utilizado como agente antioxidante en alimentos y que presenta actividad antitumoral. Debido a esto, se sintetizaron derivados catiónicos del AG (conjugados al catión lipofílico deslocalizado trifenilfosonio), los cuales se dirigen selectivamente a la mitocondria de células tumorales, guiados por su elevado potencial de membrana mitocondrial.

Para determinar la actividad antitumoral de estos derivados, se utilizó un modelo murino singénico para evaluar la inhibición del crecimiento tumoral. Los ratones portadores de tumor se trataron durante 30 días con los compuestos. Al final del tratamiento se extrajo el tejido tumoral para evaluar la expresión de Ki67 y PCNA (marcadores de proliferación celular) mediante inmunofluorescencia. El compuesto TPP⁺C₁₀ inhibió significativamente el crecimiento tumoral, por otra parte, TPP⁺C₁₂ inhibió ligeramente el crecimiento tumoral, sin ser significativo respecto al grupo control. Así mismo, los ratones tratados con TPP⁺C₁₀ mostraron menor expresión de Ki67 y PCNA respecto al grupo control.

En conclusión, los cationes derivados de ácido gálico producen inhibición en la proliferación de células tumorales, e impiden el crecimiento tumoral *in vivo*.

Agradecimientos: Proyecto FONDECYT 1130772, Beca CONICYT 21110084.

Correo electrónico: lperedo@ciq.uchile.cl

P025. ACIDO NORDIHIROGUAYARETICO INHIBE DIRECTAMENTE EL TRANSPORTE DE GLUCOSA EN CELULAS LEUCEMICAS HUMANAS (Direct inhibition by nordihydroguaiaretic acid of the transport of glucose in human leukemic cell lines).

León, D., Ojeda, L., Pérez, A., Zambrano, A., Reyes, A.M., Salas, M.,

Instituto de Bioquímica y Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

NDGA es el principal metabolito del arbusto de la creosota (*Larrea tridentata*). Dentro de sus acciones biológicas se ha informado que inhibe la proliferación de diversas líneas celulares tumorales, incluyendo células leucémicas. Se conoce que NDGA disminuye la producción de ATP mitocondrial por su acción a nivel del complejo I de la cadena transportadora de electrones. No obstante, no se ha encontrado una buena correlación entre niveles disminuidos de ATP y la inducción de muerte celular inducida por este compuesto. Como NDGA es estructuralmente similar a resveratrol, compuesto que hemos probado que es un inhibidor del transportador de hexosas GLUT1, una alternativa es que en células transformadas NDGA induzca un estado metabólico privado de energía por una disminución en la captación celular de glucosa. Para probar esta posibilidad analizamos el efecto de NDGA sobre el transporte de glucosa en células HL-60 y U937, líneas celulares humanas de leucemia promielocítica y monocítica aguda, respectivamente, las cuales captan glucosa a través de los transportadores facilitativos GLUT1 y GLUT3. Los ensayos se realizaron usando el análogo desoxiglucosa a temperatura ambiente y por tiempo cortos (30 s) para asegurar condiciones de velocidad inicial.

NDGA fue capaz de inhibir el transporte de azúcares en ensayos trans-cero de entrada en ambas líneas celulares leucémicas con valores de IC₅₀ cercanos a 10 µM. Para probar si el efecto inhibitorio de NDGA obedece a una interacción directa con GLUT1 realizamos diversos ensayos en eritrocitos humanos, células que solo expresan este transportador. En ensayos trans-cero y cis-infinito NDGA fue un eficiente inhibidor del transporte de desoxiglucosa en los eritrocitos. Además, ensayos de desplazamiento de compuestos que se unen a GLUT1 en membranas aisladas de eritrocitos humanos indican que existe una interacción directa de NDGA con el transportador de hexosas GLUT1. Los resultados indican que NDGA bloquea directamente la captación de glucosa mediado por GLUT1 en las líneas celulares leucémicas.

Agradecimientos: Financiado por FONDEF D1111131, FONDECYT 1130386, DID-UACH S-2013-20, DID-UACH S-2013-22.

Socio Patrocinante: Morera JF.

P026. GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO CELULAR DE CÁNCER DE PRÓSTATA KNOCK-DOWN PARA EL RECEPTOR LOX-1 (Generation and characterization of a cellular model of prostate cancer knock-down for the LOX-1 receptor).

Cerro, R.P.¹, González-Chavarría I.¹, Parra N.C.¹, Sandoval F.A.¹, Leiva M.J.¹, Schulz D.¹, Salas-Burgos A.M.² y Toledo J.R.¹

¹Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas; ²Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción.

Aspectos clínicos de la obesidad como el aumento en los niveles de colesterol LDL y la forma oxidada de esta lipoproteína (oxLDL), se relacionan con la progresión tumoral y la metástasis en cáncer de próstata (CaP). Estudios recientes demostraron que LOX-1 se expresa en células de CaP y en adenocarcinomas prostáticos en estadios clínicos patológicos III y IV. Sin embargo, la función de LOX-1 en CaP no está dilucidada. El objetivo del presente trabajo es generar un modelo celular de CaP con silenciamiento parcial (*knock-down*) para la expresión del receptor LOX-1 mediante transducción lentiviral. Para transformar genéticamente el modelo celular de CaP se diseñaron 3 ARN cortos con estructura de tallo y anillo (shARN) contra el gen de LOX-1. Dichas secuencias se subclonaron en un plásmido de transferencia lentiviral pLCW/U6 y la eficiencia del silenciamiento de cada uno de los shARN se evaluó en la línea celular HEK293/LOX-1(+). La expresión de LOX-1 se analizó por RT-PCR e inmunocitoquímica. El shARN con mejor capacidad de silenciamiento se utilizó para generar las partículas lentivirales. Para generar el modelo celular estable de silenciamiento, se transdujeron células de CaP con los vectores lentivirales y se demostró el silenciamiento parcial del receptor mediante análisis por RT-PCR y *Western-blot*. Nuestros resultados indican que poseemos una línea celular de CaP *Knock-down* para LOX-1 que permitirá desarrollar estudios de progresión tumoral en CaP y diseñar nuevas estrategias farmacológicas para el tratamiento del cáncer de próstata.

Agradecimientos: Fondecyt 1121159 e INNOVA BIOBIO 13.1335

Correo electrónico: ritacerro@udec.cl

Socio Patrocinante: Salas-Burgos, A.M.

P027. NUEVO MODELO CELULAR DE SOBREEXPRESIÓN DEL RECEPTOR LOX-1 PARA EL ESTUDIO DE SUS FUNCIONES EN ATROSCLEROSIS Y CÁNCER. (New model cell overexpressing the LOX-1 receptor for study its functions in atherosclerosis and cancer)

Parra, N.C.¹, Jiménez S.¹, González-Chavarría I.¹, Salas-Burgos A.M.², Zúñiga F.A.³, Sánchez O.², Toledo J.R.¹

¹Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas; ²Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas; ³Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología, Facultad de Farmacia. Universidad de Concepción.

La aterosclerosis es una patología progresiva, definida como un proceso inflamatorio crónico que se caracteriza por la acumulación de lípidos, elementos fibrosos y células proinflamatorias en las paredes de los vasos sanguíneos, siendo el elemento más importante en el desarrollo de las patologías cardiovasculares. El proceso clave es el aumento de la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (oxLDL) que se une a su receptor LOX-1. Este es un receptor tipo scavenger que presenta una baja expresión a nivel endotelial, sin embargo, la presencia de oxLDL induce una sobre-expresión de LOX-1 activando vías que generan inflamación, acumulación de lípidos y elementos fibrosos en las paredes de los vasos sanguíneos (ateroma). Recientemente se demostró una correlación positiva entre el aumento de LDL oxidada y un mayor riesgo de cáncer de colon, de mama y cáncer de ovario. Se han utilizado fármacos para el tratamiento de la aterosclerosis observándose que estos inhiben la transformación y el crecimiento del tumor, lo que sugiere la posible participación de LOX-1 en cáncer.

Nuestra propuesta de trabajo es la generación de un modelo celular que simule una condición patológica, permitiendo el ensayo posterior de moléculas terapéuticas para la aterosclerosis y cáncer. Sobre-expresamos de manera estable al receptor LOX-1 en células HEK293FT, mediante el uso de vectores lentivirales. Los lentivirus funcionan como vectores de transferencia de genes integrándose en el ADN genómico de células en división o quiescentes con una elevada estabilidad. La sobreexpresión se analizó mediante Western blot y RT-PCR. La localización del receptor LOX-1 en la membrana celular se evidenció al realizar un análisis inmunohistoquímico, y la funcionalidad se basó en la interacción del receptor con su ligando. Los resultados demuestran que poseemos una línea de células HEK293FT que expresa de manera estable el receptor LOX-1 y permite estudiar sus funciones en condiciones patológicas.

Agradecimientos: Proyecto VIU120028

Correo electrónico: natparra@udec.cl

Socio Patrocinante: Salas-Burgos, A.M.

P028. HEPARAN SULFATO A TRAVÉS DE TLR4 MODULA LA EXPRESIÓN DE IL-1 β , ICAM Y α -SMA EN FIBROBLASTOS CARDÍACOS (Heparan Sulfate, through TLR-4 modulates IL-1 β , ICAM and α -SMA expression in cardiac fibroblast).

Landaeta, R.¹, Boza P.¹, Humeres C.¹, Inostroza E.¹, Vivar R.¹, García L.², Díaz-Araya G.¹

¹Laboratorio de Farmacología Molecular Cardiovascular, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. ²Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares de la Célula, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

Introducción: En los fibroblastos cardíacos (FC) se ha estudiado que el estímulo con LPS produce cambios en la secreción de citoquinas proinflamatorias que participan en los mecanismos de reparación de tejido dañado, tras un evento injurioso sobre el músculo cardíaco. El heparan sulfato (HS) es un constituyente de la matriz extracelular de diversos órganos, entre ellos en el corazón. Su importancia radica en que este agente, puede ser liberado y fragmentado durante eventos de daño tisular y al igual que LPS son ligandos que activan el TLR4, desencadenando la respuesta inflamatoria necesaria para la reparación tisular.

Metodología: FC de ratas adultas y neonatas fueron estimulados con LPS y HS por 8 y 24 horas, y se determinaron los niveles de expresión de IL-1 β , ICAM y α -SMA por western blot. Por otro lado, se usó un inhibidor del receptor TLR-4, TAK-242; con el propósito de verificar que los efectos sobre la expresión de IL-1 β , ICAM y α -SMA, son mediados a través de este receptor.

Resultados: En FC adultos y neonatos HS modula positivamente la expresión de IL-1 β e ICAM, mientras que HS modula negativamente la expresión α -SMA en FC adultos y neonatos. Todos estos resultados fueron obtenidos en forma paralela y comparativa al estímulo con LPS, obteniendo similitud en las respuestas. Estos efectos fueron inhibidos por TAK-242

Conclusión: HS modula la expresión de IL-1 β , ICAM y α -SMA mediante el receptor TLR-4 tanto en FC adultos como en neonatos, de manera análoga que al estimular con LPS.

Agradecimientos: Proyecto FONDECYT 1130300 y Beca de Apoyo a Realización de Tesis Doctoral 24110016.

Correo electrónico: rolamil@gmail.com

Socio Patrocinante: Díaz-Araya, G.

P029. PARTICIPACIÓN DE TLR4 EN LA LIBERACIÓN DE CITOQUINAS TIPO TH1/TH2 Y EXPRESIÓN DE VCAM/ICAM EN FIBROBLASTOS Y MIOFIBROBLASTOS CARDIACOS (Role of TLR4 in Th1/Th2 cytokine release and VCAM/ICAM expression in cardiac fibroblasts and myofibroblasts).

Humeres, C.¹, Ayala P.¹, Ariel D.², Inostroza E.¹, García L.² Díaz-Araya G.A.¹

¹Laboratorio Farmacoquímica, Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. ²Laboratorio Transducción de señales moleculares, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

El receptor TLR4 es un elemento vital para el inicio y resolución de las respuestas inflamatorias, y tras su activación se induce un aumento en la producción de citoquinas, capaces de promover un mayor reclutamiento y adhesión de células inmunes al sitio del daño, mediante la expresión de moléculas de adhesión intercelular (I-CAM) y vascular (V-CAM). Existe abundante literatura que muestra que los fibroblastos y miofibroblastos cardiacos liberan citoquinas proinflamatorias y profibróticas; sin embargo, no se conoce con exactitud la participación del receptor TLR4, y si tras su activación se induce una expresión diferencial de proteínas de adhesión celular, y más aún si el perfil de citoquinas liberadas (TH1/TH2) es diferente entre fibroblastos y miofibroblastos.

Fibroblastos y miofibroblastos cardiacos obtenidos de ratas Sprague-Dawley adultas fueron estimulados con LPS (1 µg/ml, 2-48 horas) en presencia/ausencia del inhibidor específico de la señalización de TLR4 (TAK242: 1 µM), y se midieron los niveles de citoquinas tipo Th1 (IL-2, IL-12, IFN-γ, TNF-α, GM-CSF) y Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, M-CSF) liberadas al medio de cultivo. Adicionalmente, se evaluó la localización celular, los niveles de mRNA y de proteína V-CAM e I-CAM; bajo estas condiciones. La secreción de las citoquinas mencionadas fue determinada mediante el kit de MILLIPLEX[®] (Milliplex MAP Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel, Millipore, USA). Mientras que la localización celular, los niveles de mRNA y proteína de las moléculas de adhesión, V-CAM e I-CAM se determinaron mediante Inmunocitoquímica, qRT-PCR y Western Blot, respectivamente. Nuestros resultados muestran que tras la activación de TLR4, el fibroblasto cardiaco secreta un perfil de citoquinas tipo Th1, mientras que el miofibroblasto cardiaco produce un perfil predominantemente tipo Th2. En ambos tipos celulares se observó un aumento en los niveles de mRNA y proteína VCAM e ICAM, siendo mayores en los miofibroblastos que en los fibroblastos cardiacos.

Agradecimientos: FONDECYT 1130300

Correo electrónico: dhumeres@ciq.uchile.cl

Socio Patrocinante: Díaz-Araya, G.A.

P030. LPS PREVIENE LA MUERTE DE FIBROBLASTOS CARDIACOS INDUCIDA POR ISQUEMIA/REPERFUSION SIMULADA IN VITRO (LPS prevents cardiac fibroblast death induced by ischemia/reperfusion simulated in vitro).

Queirolo, C.¹, Ayala P.¹, Santana R.¹, García L.², Díaz-Araya G.¹

¹Laboratorio de Farmacología Molecular Cardiovascular, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. ²Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares de la Célula, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

Antecedentes: Fibroblastos cardiacos (FC) sometidos a 8 horas de ischemia y 16 horas de reperfusión in vitro (I/R) gatilla una pérdida de viabilidad de un 50%. Por otro lado, TLR4, receptor presente en FC, al ser activado por LPS es capaz de activar vías de sobrevida celular, tales como Akt, ERK½ y NF-kB. Sin embargo, se desconoce el rol que cumple el TLR4 frente a la muerte producida por I/R, así como el eventual efecto citoprotector inducido por la activación de este receptor durante un evento de I/R, ya sea mediante un preconditionamiento o su activación durante la I/R. Metodología: FC de ratas neonatas fueron sometidos a 8 hrs de ischemia y 16 hrs de reperfusión en presencia o ausencia de LPS durante la ischemia, reperfusión o tanto en la I/R. Se evaluó además el efecto preconditionante de LPS durante 1, 16 y 24 hrs de estímulo antes de la realización de la I/R. La viabilidad celular se determinó mediante MTT, conteo por exclusión con azul de tripan y citometría de flujo. Se determinó mediante western blot los niveles de las caspasas 3, 8 y 9.

Resultados: Posterior al evento de I/R se observó una pérdida significativa de la viabilidad celular, la cual fue prevenida significativamente al estimular a los FC con LPS durante la reperfusión así como también durante la I/R. Sin embargo, no se observó un efecto citoprotector significativo mediante el preconditionamiento con LPS. En cuanto a los niveles de las caspasas 3, 8 y 9, se observó que la estimulación con LPS provocó un aumento significativo de los niveles de las procaspasas 3, 8 y 9 posterior al evento de I/R.

Conclusión: La estimulación con LPS es capaz de prevenir la muerte de FC inducida por I/R in vitro.

Agradecimientos: Proyecto FONDECYT 1130300 y Beca de Apoyo a Realización de Tesis Doctoral 24110016.

Correo electrónico: cqueirolof@qf.uchile.cl

Socio Patrocinante: Díaz-Araya G.

P031. LA ACTIVACION DEL TLR4 POR LPS INDUCE UN AUMENTO EN LA EXPRESION DE VCAM/ICAM, VIA NF- κ B, EN FIBROBLASTOS CARDIACOS ADULTOS (ACTIVATION OF TLR-4 INDUCED BY LPS INCREASES THE EXPRESSION OF VCAM / ICAM, THROUGH NF-KB, IN ADULT CARDIAC FIBROBLASTS).

Inostroza, E.¹, Humeres C.¹, Ayala P.¹, Ariel D.², Díaz-Araya G.¹, García L.²

¹Laboratorio Farmacoquímica, Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. ²Laboratorio Transducción de señales moleculares, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

INTRODUCCION: TLR-4 forma parte de los receptores reconocedores de patrones que tienen un papel central, tanto en la detección de patógenos, como en la iniciación y resolución de las respuestas inflamatorias, y tras su activación se induce un aumento en la expresión de moléculas de adhesión intercelular (I-CAM) y vascular (V-CAM).

Se ha demostrado en modelos celulares epiteliales y macrófagos, que tras la activación del TLR-4, aumenta la expresión de moléculas de adhesión celular a través de la fosforilación de NF- κ B. Sin embargo, en fibroblastos cardiacos no se ha estudiado el rol del TLR-4 en la expresión de dichas proteínas.

METODO: fibroblastos cardiacos obtenidos de ratas Sprague-Dawley adultas fueron estimulados con LPS (1 μ g/ml, 5min-48 horas) en presencia/ausencia de los inhibidores específicos, de TLR4 (TAK242: 1 μ M), y p-NF- κ B (Bay 11-7085;). Adicionalmente se evaluó la translocación al núcleo de p-NF- κ B y la localización celular y el aumento en la expresión de V-CAM/I-CAM; determinándose mediante Inmunocitoquímica y Western Blot, respectivamente.

RESULTADOS: se observó que tras la activación de TLR4, el fibroblasto cardiaco produjo un aumento temprano en los niveles de p-NF- κ B con un peak a los 15 minutos y un aumento en la expresión de VCAM e ICAM, desde las 4 horas con un peak a las 48 y 24 horas respectivamente. El aumento en la expresión de VCAM/ICAM fue inhibido completamente al usar Bay 11-7085 y TAK-242.

CONCLUSION: en fibroblastos cardiacos adultos la activación del TLR4 por LPS induce un aumento en la expresión de VCAM/ICAM, a través de NF- κ B.

Agradecimientos: FONDECYT 1130300

Correo electrónico: Elias.ins1990@hotmail.com

Socio Patrocinante: Díaz-Araya, G.A.

P032. LPS A TRAVÉS DE TLR4 PREVIENE LA DIFERENCIACIÓN DE FIBROBLASTO A MIOFIBROBLASTO INDUCIDA POR TGF- β ₁ (LPS through TLR4 prevents the differentiation of fibroblast to myofibroblast induced by TGF- β ₁).

Santana, R.¹, Ayala P.¹, Queirolo C.¹, Vivar R.¹, García L.², Díaz-Araya G.¹

¹Laboratorio de Farmacología Molecular Cardiovascular, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. ²Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares de la Célula, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

Antecedentes: La diferenciación de fibroblastos cardiacos (FC) a miofibroblastos cardiacos (MFC) es gatillada por TGF- β ₁, la cual señala principalmente a través de las proteínas Smad. Los MFC muestran como principal característica la presencia de microfilamentos citoplásmicos de α -SMA, estructuradas como fibras de estrés, lo que les permite la contracción. Por otro lado, LPS es un ligando del receptor TLR4, que señala de manera dependiente e independiente de MyD88 teniendo como principal efector el NF- κ B, induciendo así la expresión de genes de citoquinas proinflamatorias. Sin embargo, aunque se ha descrito un efecto antagónico entre la señalización inducida por LPS y la señalización canónica de TGF- β , a la fecha no se ha estudiado si en FC y en MFC la expresión de α -SMA inducida por TGF- β ₁ es antagonizada por LPS.

Metodología: Se aislaron FC de ratas adultas las cuales fueron estimuladas con LPS o TGF- β ₁ por 24, 48, 72 y 96 hrs, o con LPS por 72 hrs en presencia o ausencia de TAK-242 (inhibidor del receptor TLR4) y se determinó la expresión α -SMA por western blot e inmunocitoquímica. Por otro lado, se determinaron los niveles de TGF- β ₁, TGF- β ₂, TGF- β ₃ mediante Multiplex.

Resultados: TGF- β ₁ induce la expresión de α -SMA de manera tiempo y concentración dependiente. LPS disminuye la expresión de α -SMA tanto en FC como en MFC, alterando su distribución y la localización intracelular. Por otro lado, la disminución de la expresión de α -SMA gatillada por LPS, es inhibida significativamente por TAK-242, indicando la participación del receptor TLR4. Además, los FC son capaces de secretar TGF- β _{1,2,3}, lo que sugiere que habría un mecanismo autocrino por el cual se mantiene la expresión basal de α -SMA.

Conclusiones: LPS es un modulador negativo de la expresión de α -SMA en FC y MFC de ratas adultas.

Agradecimientos: Proyecto FONDECYT 1130300 y Beca de Apoyo a Realización de Tesis Doctoral 24110016.

Correo electrónico: roxana.santana.s@gmail.com

Socio Patrocinante: Díaz-Araya, G.

P033. LA ACTIVACIÓN DE TLR-4 INDUCIDA POR LPS MODULA LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES B1 Y B2 DE CININAS EN FIBROBLASTOS Y MIOFIBROBLASTOS CARDÍACOS (TLR-4 activation induced by LPS modulates B1 and B2 kinin receptors expression in cardiac fibroblasts and myofibroblasts).

Muñoz Rodríguez, C.¹, García L², Díaz-Araya G¹

¹ Laboratorio de Farmacología molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. ² Laboratorio de Transducción de señales moleculares, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Los receptores de tipo Toll (TLR) sensan componentes degradados de la matriz extracelular y proteínas citosólicas liberadas al medio extracelular, por eventos de daño tisular, así como también, productos de origen bacteriano, dando origen a una respuesta inflamatoria. Tras su activación, el factor transcripcional NF- κ B modula esta respuesta y regula la secreción de citoquinas inflamatorias, proteínas de adhesión, etc.

Las cininas a través de los receptores B1 y B2 (B1R y B2R), regulan el desarrollo de fibrosis cardíaca. La ausencia de B1R y B2R es deletérea a nivel cardíaco, especialmente en la respuesta frente a injuria. En fibroblastos (FC) se ha descrito la presencia de B2R, mientras que B1R se encuentra en el núcleo. A su vez, los miofibroblastos (MFC) expresan tanto B1R como B2R. En fibroblastos de piel se ha demostrado la activación de TLR-4 induce la expresión de B1R; sin embargo, hasta la fecha se desconoce si en los FC y los MFC, la activación de TLR4 induce la expresión de B1R y B2R. Se postula que en FC y MFC la activación de TLR4 a través de NF- κ B induce la expresión de B1R y B2R; y que TLR4 previene el desarrollo de fibrosis cardíaca.

Los FC y MFC de ratas neonatas fueron estimulados con LPS (1 μ g/ml, 0-72 horas) y por IWB se determinó que LPS induce la expresión de B1R y B2R, mientras que por ICQ se determinó que en FC existe una relocalización de B1R. Se determinó que la expresión de B1R y B2R es controlada por NF- κ B y no así por ERK1/2 o Akt. Finalmente, LPS en conjunto con BK disminuyen la síntesis de colágeno.

Conclusión: TLR4 vía NF- κ B regula la expresión de B1R y B2R y la síntesis de colágeno.

Agradecimientos: FONDECYT 1130300

Correo electrónico: clodito@ciq.uchile.cl

Socio Patrocinante: Díaz-Araya, G.A.

P034. ENSAMBLAJE Y ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA EN FIBROBLASTOS CARDÍACOS (Assembling and activation of the inflammasome in cardiac fibroblasts).

Boza, P.¹, Ayala P¹, García L², Díaz-Araya G¹.

¹Laboratorio de Farmacología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. ²Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Estudios recientes han demostrado que en situaciones estériles existe una respuesta inflamatoria proveniente del daño tisular, la cual es mediada a través de un complejo multi-protéico denominado inflammasoma. Este complejo consta de tres diferentes proteínas: proteínas sensoras (NLRP), proteínas adaptadoras (ASC) y proteínas efectoras (caspasa-1).

Se ha demostrado que NLRP3 se encuentra sobreexpresado a nivel miocárdico luego de un infarto al miocardio, encontrándose principalmente en las células de tipo no-cardiomiocito (por ejemplo en los fibroblastos).

En el modelo actual del inflammasoma hay dos distintas señales de activación. La primera señal puede ser desencadenada por varios PAMPs o DAMPs que llevan a la activación de los TLR, y a la transcripción de genes que codifican para la pro-IL-1 β y NLRP3. La segunda señal corresponde a ligandos del inflammasoma, que actúan a través de los NLR citosólicos, conduciendo al ensamblaje y activación del inflammasoma; y al corte de la pro-IL-1 β y pro-IL-18 en sus formas activas.

Estudios recientes han descrito que Ca²⁺ intracelular, puede promover el ensamblaje del inflammasoma, actuando como un segundo mensajero. Al mismo tiempo, se ha descubierto que su contraparte, el cAMP, sería capaz de interaccionar con NLRP3, impidiendo el ensamblaje de éste.

En este trabajo se plantea la capacidad de los fibroblastos cardíacos de rata neonata de ser células que presentan los componentes del inflammasoma y que señales presentes a nivel cardíaco, como angiotensina II, bradiquinina e isoproterenol pueden inducir o prevenir el ensamblaje de éste.

Los resultados obtenidos han demostrado que los fibroblastos cardíacos presentan los tres componentes del inflammasoma: NLRP3, ASC y caspasa 1 (Western blot). Asimismo, se ha demostrado que el LPS, sería capaz de generar la síntesis de pro-IL-1 β (Western blot) y que ésta puede ser escindida y liberada como IL-1 β (ELISA) por medio de señales que median Ca²⁺.

Agradecimientos: Proyecto FONDECYT 1130300

Correo electrónico: pboza@ciq.uchile.cl

P035. ÁCIDO BUTÍRICO INDUCE LA MOVILIZACIÓN DE CALCIO, LIBERACIÓN DE GRÁNULOS Y AUMENTA LA LIBERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO EN NEUTRÓFILOS DE BOVINO (Acid butyric induced calcium mobilization, granules release and increases release of reactive oxygen species in bovine neutrophils)

Hidalgo, A.I.¹, Carretta M.D.¹, Loncoman, C.¹, Burgos, J.¹, Hidalgo, M.A.¹, Burgos, R.A.¹

¹Laboratorio de Farmacología de la Inflamación, Instituto de Farmacología y Morfofisiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

El ácido butírico es un ácido graso de cadena corta (AGCC) producido por la fermentación microbiana en el tracto gastrointestinal. Además, de ser sustrato para la producción de energía, el ácido butírico puede tener otros efectos más allá de los nutricionales. Estudios de nuestro laboratorio han demostrado que propionato, otro AGCC, afecta la función del neutrófilo de bovino a través de la movilización de calcio y liberación de gránulos, sin embargo, es desconocido si ácido butírico ejerce funciones similares. El ácido butírico es ligando para los receptores acoplados a proteína G GPR41 y GPR43, y debido a la presencia de estos receptores en neutrófilos de bovino, evaluamos el efecto del ácido butírico sobre la movilización de calcio intracelular, la liberación de gránulos y de especies reactivas del oxígeno en neutrófilos de bovino aislados de sangre venosa. Observamos que el tratamiento con 0.1 mM de ácido butírico indujo la movilización de calcio intracelular en neutrófilos marcados con FURA2-AM. Se demostró la contribución del calcio extracelular e intracelular con el uso de EGTA y BAPTA/AM y la participación de fosfolipasa C con el uso de U73122 en este efecto. Además el ácido butírico indujo significativamente la liberación de MMP-9 y lactoferrina en neutrófilos medido mediante zimografía y ELISA, respectivamente. Por último el ácido butírico no mostró un efecto en la liberación de ROS medido a través del uso de luminol, sin embargo aumentó el efecto provocado por el quimioattractante PAF. Estos resultados demuestran la existencia de una relación entre el metabolismo de los ácidos grasos volátiles de cadena corta y el potencial rol modulador de la respuesta inmune e inflamatoria en bovinos.

Agradecimientos: Proyecto FONDECYT 1120718

Socio Patrocinante: Burgos, R.A.

P036. EFECTO DEL AMILORIDE EN LA SECRECIÓN DE MMP-9 Y LACTOFERRINA DE NEUTRÓFILOS BOVINOS (Effect of amiloride on the secretion of MMP-9 and lactoferrin of bovine neutrophils).

Larrazabal, C.; Carretta, M.D.; Burgos, R.A.

Instituto de Farmacología y Morfofisiología. Laboratorio de Farmacología de la Inflamación. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile.

Los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) son la primera línea de defensa leucocitaria contra agentes bacterianos y fúngicos. Su acción antimicrobiana la ejerce a través de mecanismos oxidativos, como la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y mecanismos no oxidativos como la degranulación de vesículas con enzimas y proteínas con efecto antimicrobiano, no obstante, ambos mecanismos también son capaces de generar un efecto deletéreo en el tejido circundante. El control del pH_i es clave en la función microbicida, el cual es regulado por transportadores como el NHE-1, capaz de expulsar protones de la célula al intercambiarlos por Na⁺. No es conocido el rol de NHE-1 en la liberación de gránulos en neutrófilos de bovinos. Por esta razón se evaluó si amiloride, un inhibidor de NHE-1, reduce la liberación de MMP-9 y lactoferrina en neutrófilos bovinos estimulados con factor activante plaquetario (PAF), Pam₃CSK₄ y LDBK. Para cada experimento se usaron 1 x 10⁶ neutrófilos. Las células fueron pre incubadas con diferentes concentraciones de amiloride, para luego ser estimuladas con LDBK, PAF y Pam₃CSK₄ durante 6, 10 y 30 minutos respectivamente. Para la detección de MMP-9 se evaluó la actividad gelatinolítica mediante zimografía, mientras que la liberación de lactoferrina se cuantificó mediante un kit comercial de ELISA para lactoferrina bovina. Demostramos que sólo PAF estimuló significativamente la liberación de gránulos que contenían lactoferrina y MMP-9, mientras que amiloride disminuyó la secreción de MMP-9 en neutrófilos activados con 100 nM de PAF. Esto sugiere que la liberación de MMP-9 inducido por PAF en neutrófilos de bovinos sería dependiente de NHE-1.

Agradecimientos: Financiado por FONDECYT 1120718.

Correo electrónico: camilo.larrazabal.r@gmail.com

P037. EXPRESIÓN DE UNA VARIANTE DE TNF α SOLUBLE *IN VITRO* COMO MODELO PARA APLICACIONES TERAPÉUTICAS (Expression in vitro of a soluble TNF α variant as model for therapeutic applications).

Valenzuela, J.P.¹, Saavedra, P.¹, Meza C.¹, Maura-Pérez R.¹, Aylwin C.¹, Salas-Burgos A.M.², Sánchez O.², Toledo J.R.¹

¹Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas; ²Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción.

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) es una citoquina sintetizada por las células presentadoras de antígenos, subtipos de células T y mastocitos que tiene múltiples funciones relacionadas con la transcripción de genes involucrados en los procesos de apoptosis, proliferación y diferenciación celular. La sobreexpresión de TNF α y la activación de las vías de señalización de alguno de sus receptores (TNFR1 y TNFR2) se han asociado con patologías autoinmunes, neurodegenerativas y neoplásicas. Por esta razón se han desarrollado fármacos basados en anticuerpos capaces de bloquear la unión de la citoquina a uno o ambos receptores. El objetivo del presente trabajo consiste en la generación de una variante soluble del TNF α humano como blanco para el diseño de nuevas drogas terapéuticas basadas en el bloqueo de esta citoquina. Para se diseñó un gen artificial que codifica el péptido de secreción de la eritropoyetina humana, sucedido de seis residuos de histidina, un espaciador flexible y finalmente la secuencia del TNF α soluble humano. El gen artificial se obtuvo por síntesis química y se subclonó en el vector pAdTrack de transferencia adenoviral, que se utilizó como vehículo para la transformación genética de células humanas HEK-293. Mediante ensayos de Western se identificó la expresión de TNF α soluble en su forma trimérica en el medio de cultivo de las células transformadas, y la citoquina recombinante se purificó mediante cromatografía de afinidad, demostrando que mantenía su actividad biológica en células L929. Esta variante recombinante del TNF α humano como una herramienta con un elevado potencial para identificar y generar terapias basadas en fragmentos de anticuerpos mediante la tecnología de tamizaje de bibliotecas de fagos filamentosos.

Agradecimientos: Fondecyt 1121159

Correos electrónicos: jvalenzuela@udec.cl
psaavedra@udec.cl

Socio Patroncinante: Salas-Burgos A.

P038. SEVERIDAD DE RESPUESTA HISTOLOGICA EN PNEUMOCYSTOSIS EXPERIMENTAL INDUCIDA POR BETAMETASONA VERSUS CICLOFOSFAMIDA.

Ponce, C.A.¹, Bustamante R.¹, Mendez A.¹, Iturra, P.¹, Vargas S.L.¹

¹Laboratorio de Infecciones Respiratorias, Programa de Microbiología y Micología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La inmunosupresión inducida por Betametasona (BM), o Ciclofosfamida (CY), favorece infecciones oportunistas, como Pneumocystosis. Ésta infección induce cambios en el epitelio de la vía aérea, que pueden afectar la función pulmonar. Nuestro objetivo fue comparar los cambios histológicos durante la Pneumocystosis inducida por BM y CY.

56 ratas Sprague-Dawley fueron divididas en 4 grupos: BM, CY, BM+Cotrimoxazol y CY+Cotrimoxazol, mantenidas en jaulas con aire filtrado (HEPA). La mitad de las ratas fueron anestesiadas y sacrificadas mediante exanguinación vía vena cava y la otra mitad por fijación pulmonar in situ con formalina tamponada 3,7% para realizar análisis histológico. *Pneumocystis* se diagnosticó por PCR y su carga se estimó semicuantitativamente usando tinción de Gomori-Grocott. Las áreas de infiltrado perivascular, el grosor del epitelio bronquiolar, el porcentaje del epitelio ocupado por mucinas, y el grosor de los depósitos peribronquiales de reticulina fueron medidos en cortes histológicos (5 μ m) teñidos con Hematoxilina-eosina, Alcian blue-PAS y Gordon-Sweet, usando microscopio OLYMPUS BX60 con Software Image-Pro® Plus 5.1.2.

Todas las ratas desarrollaron Pneumocystosis. Las áreas de infiltrado perivascular fueron mayores en el grupo con CY. El grosor epitelial aumentó en las ratas con CY en relación al control, $p<0.05$. El porcentaje del epitelio bronquiolar ocupado por mucinas fue mayor en el grupo con CY, $p<0.05$. Los depósitos de reticulina fueron mayores en el grupo con BM $p<0.05$.

Los resultados traducen la inmunosupresión marcada y global que induce BM en relación a CY. Lo anterior apoya el concepto que el tipo de daño histológico de PcP es altamente dependiente de la respuesta del hospedero.

Agradecimientos: FONDECYT Regular 1100225

Correos electrónicos: svargas@med.uchile.cl

P039. LA INFECCIÓN PRIMARIA POR *PNEUMOCYSTIS* PRODUCE CAMBIOS PATOLÓGICOS EN EL EPITELIO RESPIRATORIO DE RATAS INMUNOCOMPETENTES (The primary *Pneumocystis* infection inducing pathological change in airway epithelium of immunocompetent rats).

Iturra, P.¹, Pérez, F.¹, Ponce C.A.¹, Rojas, D.¹, Bustamante, R.¹, Ponce, N.¹, Vargas, S.L.¹.

¹Programa de Microbiología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Pneumocystis es un hongo que puede producir una neumonía grave en hospederos inmunocomprometidos. En cambio, la infección en el inmunocompetente es "asintomática" y por esto no se le considera. Hemos demostrado recientemente que esta infección aumenta la secreción de moco pulmonar en lactantes menores de 6 meses fallecidos con diagnóstico de muerte súbita, sugiriendo un rol en esta patología. A objeto de reconocer histológicamente este y otros posibles daños pulmonares en animales inmunocompetentes, evaluamos la respuesta inflamatoria y secretora de la vía aérea en ratas Sprague-Dawley hembras cursando su infección primaria por *Pneumocystis*. Treinta ratas fueron mantenidas en jaulas con aire filtrado (HEPA) desde el nacimiento. La mitad (n=15) fue expuesta al nacer a ratas con PcP para asegurar el contagio. Las ratas del grupo control (n=15) fueron tratadas con profilaxis anti-*Pneumocystis* (Cotrimoxazol) en el agua de beber durante todo el experimento. Cinco ratas por grupo fueron anestesiadas con Ketamina-Xilacina y sacrificadas a los 46, 60 y 75 días de edad mediante fijación pulmonar *in situ* perfundiendo formalina 10% vía vena cava. Sus pulmones fueron extraídos post-fijación intra-torácica y examinados mediante microscopía para determinar el área porcentual del epitelio bronquiolar ocupado por mucinas, el espesor del epitelio, y el espesor de los depósitos de reticulina peribronquial en cortes histológicos del lóbulo izquierdo completo, teñidos con Alcian-Blue/PAS, Hematoxilina-Eosina y Gordon-Sweet respectivamente. Los resultados demuestran un aumento progresivo del espesor del epitelio bronquiolar ($p<0,001$), del área del epitelio bronquiolar ocupado por mucinas ($p<0,001$) y de los depósitos de reticulina ($p<0,01$) a partir del día 60 en el grupo de ratas con *Pneumocystis* y no así en las ratas control. Esto demuestra por primera vez que *Pneumocystis* altera consistentemente el epitelio de la vía aérea del hospedero inmunocompetente y le sugiere un rol patogénico en patología respiratoria.

Agradecimientos: Proyecto FONDECYT 1100225. Beca Conicyt de Doctorado Nacional.

Correo electrónico: svargas@med.uchile.cl

P040. EFECTO DE PENTAMIDINA SOBRE UN MODELO EXPERIMENTAL DE INFECCIÓN POR *Trypanosoma cruzi* (Effect of pentamidine on an experimental model of infection by *Trypanosoma cruzi*).

Díaz, M.V., Campos-Estrada, C., Maya, J.D., López-Muñoz, R.

Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM. Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Pentamidina es una diamidina aromática con efecto antiprotozoario y fungicida, usada en el tratamiento de la leishmaniasis y la tripanosomiasis africana. A pesar de su extensivo uso como antiparasitario, existe poca evidencia sobre su uso contra el *Trypanosoma cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas. Previamente, hemos descrito que pentamidina es capaz de bloquear el transporte de putrescina y espermidina en *T. cruzi* (moléculas esenciales para la formación de tripanotión), y que además disminuye la sobrevivencia del parásito y la carga parasitaria en modelos *in vitro* de infección. En este trabajo estudiamos el efecto *in vivo* de pentamidina sobre un modelo experimental de la enfermedad de Chagas. Ratones BALB/c fueron infectados con tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y), y fueron tratados por 10 días con pentamidina (4 y 8 mg/kg) por vía intraperitoneal. En estos ratones se evaluó sobrevivencia, parasitemia, carga parasitaria e histología cardíaca. Pentamidina 8 mg/kg disminuyó significativamente la parasitemia y aumentó la sobrevivencia de los ratones infectados. Además, pentamidina a 8 mg/kg disminuyó la carga parasitaria en el corazón y disminuyó la inflamación del tejido cardíaco. Estos datos aportan información útil en la evaluación de las diamidinas aromáticas como potenciales agentes antichagásicos.

Agradecimientos: Financiado por Proyectos FONDECYT 11110182, U-INICIA 11/07.

Correo electrónico: mvdiaz2@uc.cl

Socio Patrocinante: López, R.

P041. EL RECEPTOR GPR40/FFA1 PARTICIPA EN LA ACTIVACIÓN DE METALOPROTEINASA 9 A TRAVÉS DE LA VÍA ERK1/2 EN NEÚTROFILOS BOVINOS (GPR40/FFA1 receptor participate in metalloproteinase 9 activation through pathway ERK1/2 in bovine neutrophils).

Mena, S.J.^{1,2}, Manosalva, C.¹, Burgos, R.A.¹, Hidalgo, M.A.¹.

¹Laboratorio de Farmacología Molecular, Instituto de Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Chile. ²Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Nariño, Colombia.

El incremento de los niveles plasmáticos de ácidos grasos de cadena larga (AGCL), se ha relacionado con un desequilibrio de la función inmune innata en bovinos. Los neutrófilos son la primera línea de defensa contra microorganismos patógenos, a través de la activación de los mecanismos oxidativos y no oxidativos, tales como la producción de superóxido y la liberación de gránulos. Los neutrófilos bovinos expresan el receptor GPR40/FFA1 para AGCL, sin embargo, su papel en la activación de las vías intracelulares y metaloproteinasas-9 (MMP9) es desconocido. El objetivo de este estudio fue investigar si GPR40/FFA1 regula la activación de MAPK, PI3K y NF- κ B y liberación de MMP9 en los neutrófilos. Para ello, neutrófilos bovinos fueron incubados con o sin GW1100 10 μ M, antagonista de GPR40/FFA1 o inhibidores de MAPK y posteriormente con agonistas de GPR40/FFA1 (GW9508 10 μ M, ácido linoleico (LNA) 100 μ M ó ácido oleico (OLA) 300 μ M). La fosforilación de ERK1/2, p38 MAPK y Akt se evaluó mediante inmunoblot, la activación de NF- κ B a través de la degradación de I κ B α por citometría de flujo y la actividad de MMP9 por zimografía. OLA, LNA y GW9508 aumentaron la fosforilación de ERK1/2, p38 MAPK y Akt y redujeron los niveles de I κ B α . GW1100 redujo significativamente la fosforilación de estas proteínas y provocó el aumento de los niveles de I κ B α a niveles similares al control. Agonistas de GPR40/FFA1 aumentan la actividad MMP9, y GW1100 e inhibidores de la ERK1/2 redujeron la actividad MMP9. La activación de GPR40/FFA1, controla "corriente abajo" la activación de las vías ERK1/2, p38 MAPK, PI3K/Akt y NF- κ B, y a través de ERK1/2 regula la actividad de MMP9, demostrando que los AGCL desempeñan un papel importante en la función de los neutrófilos y es mediada por GPR40/FFA1.

Agradecimientos: DID UACH, Fondecyt 11100413

Correo electrónico: jmenahuertas@ymail.com

Socio Patrocinante: Hidalgo, M.A.

P042. POSIBLE SITIO DE UNIÓN DE ALFXOLONA, MODULADOR ALOSTÉRICO Y ACTIVADOR DEL RECEPTOR P2X4 (Possible binding site of alphaxolone, an allosteric modulator an activator of P2X4 receptors).

Navarrete, C.¹, Alvial, N.¹, Escalona, Y.³, Pérez-Acle, T.³, Barrera, N.¹ y Huidobro-Toro, J.P.²

¹Lab de Estructura de Proteínas de Membrana y Señalización.

²Lab de Nucleótidos, Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile.

³Fundación Ciencia para la Vida, Santiago, Chile

Receptor P2X4 (P2X4R) es un canal iónico activado por ATP, permeable a Na⁺ y Ca²⁺. P2X4R es modulado de forma alostérica por diferentes moléculas, incluyendo metales trazas, esteroides y drogas como ivermectina. Nuestro laboratorio describió que 1-3 μ M alfaxolona, neurosteroides sintético con propiedades anestésicas, es un modulador alostérico positivo de P2X4R (Codocedo et al., 2009). Concentraciones 10 veces mayores, genera por sí sólo, en ausencia de ATP, corrientes sensibles a suramina y zinc, sugiriendo que este compuesto puede abrir el canal. En cambio, este esteroide no modula la acción de ATP ni abre el P2X2R, indicando que el efecto de este compuesto es selectivo para el P2X4R. Además, mediante registros electrofisiológicos en modalidad whole cell en HEK293 se demostró que en la quimera P2X4R/P2X2R (extracelular de P2X4R, transmembrana y citoplasmático de P2X2R), alfaxolona no altera las corrientes inducidas por ATP, sugiriendo que el posible sitio de unión del esteroide está en la zona transmembrana del P2X4R. Gracias a la reciente publicación del cristal de P2X4R de *Danio rerio* en estado apo-cerrado y holo-abierto (este último con 3 moléculas de ATP unidas al sitio ortostérico) se conoce la estructura extracelular y transmembrana del canal. Basado en este receptor, se procedió a realizar un modelo para el receptor P2X4R de *Rattus norvegicus*, dicho modelo incluye el dominio citoplasmático ausente del cristal. Los modelos generados fueron estabilizados en una membrana artificial modelo y posteriormente se realizó una dinámica *all-atom* con una y tres moléculas de alfaxolona, tanto en estado apo-cerrado como en estado holo-abierto. De esta forma se determinó no sólo el posible sitio de unión de alfaxolona, sino también el cambio conformacional que podría inducir este esteroide en la estructura del canal. Estos análisis demuestran la importancia y el apoyo de la bioinformática en los estudios de modelación de receptores y su funcionamiento molecular.

Agradecimientos: Financiado por Proyecto NuBEs P10-035F, Millennium Nuclei on Structural Biology Núcleo NuBEs.

Correo electrónico: cnavarrete@uc.cl

Socio Patrocinante: Huidobro-Toro, J.P.

P043. BLOQUEO DE LA LIBERACIÓN DE ATP Y NORADRENALINA DESDE TERMINALES NEURONALES PERIFÉRICOS, POSIBLE INTERACCIÓN ENTRE POBLACIONES DE NEUROTRANSMISORES (Blocking the release of ATP and noradrenaline from peripheral nerve terminals, possible interaction between populations of transmitters).

Cayupe, B., Donoso, M.V., Lara, H., Huidobro-Toro, J.P., Barra, R.

Laboratorio de Nucleótidos, Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile, Santiago, CHILE

Se postula que el transporte y almacenamiento de nucleótidos en vesículas sinápticas es mediado por VNUT. Para investigar si la liberación vesicular de ATP es bloqueada por inhibidores de VNUT, como azul de Evans (aE), realizamos estímulos eléctricos (60V, 20Hz, 1msec durante 1 min), de la red neuronal perivascular del lecho arterial mesentérico aislado de ratas Sprague Dawley, perfundido con buffer Tyrode (control) y suplementado con 1 μ M aE. Además, se estudiaron mesenterios de ratas reserpinizadas (2mg/kg por 48 h). Se recoge el perfusado de la red para analizar simultáneamente ATP (eteno-derivados fluorescentes) y noradrenalina (NA, detección electroquímica). Se registran cambios en la presión de perfusión de la red arterial. El ATP determinado en el medio de perfusión fue $85,83 \pm 24,40$ pmol (control, n=8); valor que disminuye a $4,47 \pm 1,73$ pmoles (95%, n=5, $P < 0,013$) en presencia de aE. La liberación en las ratas reserpinizadas fue $27,6 \pm 7,30$ pmoles ATP n=5, $P < 0,0475$ respecto al control). La NA determinada en el perfusado fue $2084 \pm 277,4$ pmol (control); en presencia de aE la liberación disminuyó a $552,5 \pm 87,76$ pmol (n=4). En los mesenterios de ratas reserpinizadas, la liberación de NA disminuyó a $22,41 \pm 19,97$ pmol (n=4). El estímulo eléctrico aumentó la presión de perfusión de ratas control en $79,75 \pm 8,917$ mmHg (n=10), en presencia de aE ($75,00 \pm 12,35$ mmHg, n=4), muy diferente del observado en tejidos de animales reserpinizados ($11,00 \pm 6,0$ mmHg, n=4, $P < 0,01$, respecto al control). Estos resultados son la primera descripción funcional de la participación del transportador de nucleótidos VNUT en la actividad de una neurona simpática periférica. Llama la atención que tanto aE como reserpina disminuyen la liberación de ambos co-transmisores simpáticos, lo que sugiere mecanismos de control y regulación entre las poblaciones de estos neurotransmisores. Proponemos específicamente que, la disminución de la población vesicular de NA generaría, por un mecanismo aún desconocido, una menor liberación de ATP.

Agradecimientos: Financiamiento Fondecyt de Postdoctorado 3130573 y Proyecto Fondecyt 1110672

Correo electrónico: rbarrap@uc.cl, bcayuper@uc.cl

Socio Patrocinante: Huidobro-Toro, J.P.

P044. ACTIVACION DE RECEPTOR PAR1 INDUCE LIBERACIÓN EXTRACELULAR DE ATP DE CÉLULAS ENDOTELIALES EN CULTIVO (PAR1 receptor activation in cultured endothelial cells leads to extracellular ATP release).

Donoso, M.V., Raso, S., Huidobro-Toro, J.P.

Laboratorio de Nucleótidos, Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile, Santiago, CHILE.

La activación de receptores por proteasas (PAR) como trombina y péptidos sintéticos, liberan ATP al medio de cultivo de células epiteliales respiratorias; este efecto es mediado por Rho quinasa. Nuestros estudios previos demostraron que estímulos mecánicos por suave "pipeteo" (EMP) del medio extracelular en células endoteliales del lecho arterial mesentérico de rata, liberan ATP por un mecanismo desconocido. Para determinar si la vía de liberación de ATP inducida por EMP es semejante al mecanismo de secreción extracelular inducido por agonistas PAR1, se crecieron células endoteliales y se las estimuló con agonistas PAR, con EMP y ambos estímulos simultáneamente. Se determinó la concentración de ATP/metabolitos en el medio extracelular antes (basal) y después de tratamientos. 0.3 U trombina aumentó la liberación basal de ATP 55 ± 2 % (n=5, $p < 0.05$). Después de 1 minuto de EMP el valor basal aumentó 16 veces (n=10); en presencia de trombina mas EMP, aumenta 31,7 veces (n=6, $p < 0.05$). De igual modo, 10 μ M H-Thr-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-OH (TRAP-6) remedia el efecto de la trombina, aumentando el nivel basal en 94 % (n=16, $p < 0.05$), y aumenta 1,5 veces los valores de ATP liberado por EMP (n= 16, $p < 0.05$). En cambio, H-Thr-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-OH resultó inactivo. Para examinar si la Rho quinasa está involucrada en la vía de liberación del ATP se utilizó 10 nM H1152P. Este inhibidor reduce la liberación basal (40 %) y no modifica la liberación por EMP, no obstante, reduce en un 41.5 % la liberación por EMP en presencia de TRAP-6. Estos resultados permiten concluir que el receptor PAR de las células endoteliales participa en la liberación de ATP y en su vía de transducción intracelular la Rho quinasa tiene un rol. En contraste, la liberación de ATP por EMP es independiente de la actividad de esta enzima.

Agradecimientos: Financiado por Proyecto FONDECYT 1110672, Centro CARE BASAL PFB 12/2007, Millennium Nuclei on Structural Biology Núcleo NuBEs.

Correo electrónico: verodonoso@hotmail.com

P045. SECRECIÓN DE ATP AL MEDIO DE CULTIVO Y TRANSIENTES DE CALCIO CAUSADOS POR ESTÍMULO MECÁNICO GENERADO POR PICOSPRTZER EN DOS TIPOS CELULARES (ATP secretion to the cell media and calcium transients elicited by a picospritzer buffer puff in two cultured cell types).

González-Gómez, L.M., Donoso, M.V., Huidobro-Toro, J.P.

Laboratorio de Nucleótidos, Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile

Muchas células generan respuestas fisiológicas de distinta naturaleza frente a estímulos mecánicos, aparentemente detectados por mecanorreceptores. Estudiamos si la aplicación de un estímulo mecánico en cultivos de células HeLa o cultivos primarios de células endoteliales de la red arterial mesentérica de ratas (endoteliales) secreta ATP al medio extracelular y causa transientes de calcio intracelular. Como estímulo mecánico se utilizó un *puff* de 600 µl de tampón impulsado por 40 psi de N₂ por 450 msec mediante un equipo Picospritzer III. En ambos tipos celulares, este estímulo causó secreción de ATP con un curso temporal bien definido, que en ambas células se observa un máximo a los 3 segundos post estímulo. En células HeLa, el nivel de ATP aumentó 7 veces la basal (desde 87±7.7 a 610±40 pmol/10⁶ células, n=13, P<0.005); éste decae en dos fases alcanzando su basal en 25 min. En células endoteliales, el ATP basal aumentó 10 veces (de 70.2±7.8 a 697.8±65.2 pmol/10⁶ células, n=4, P<0.05); decae en dos fases, con un segundo componente más lento. Luego de incubar células HeLa con apirasa (4U/mL) y aplicar un *puff* de tampón, no se observó el alza de ATP, pero cambió el perfil de los nucleótidos secretados. El alza de ATP causado por el *puff* se asocia con movilización de calcio intracelular medido con Fura2. En estas células apirasa disminuyó los transientes de calcio; 10 µM suramina sólo bloquea en 24% de las células que generan dichos transientes. En conclusión, se propone que en ambos tipos celulares el estímulo mecánico causado por el *puff* es aparentemente detectado por mecanosensores que mediante un mecanismo aún desconocido aumenta rápidamente la secreción extracelular de un reservorio de ATP intracelular como señal auto/paracrina. El ATP secretado por el *puff*, induce movilización de calcio, que es mediado en parte por purinoceptores sensibles a suramina.

Agradecimientos: Financiado por proyectos FONDECYT 1110672, Millennium Nuclei on Structural Biology Núcleo NuBEs y Centro CARE BASAL PFB 12/2007.

Correo electrónico: lmgonza1@uc.cl

Socio Patrocinante: Donoso, M.V.

P046. EFECTO DE TAURINA EN LA TASA DE INTERCAMBIO DE NUCLEÓTIDOS EN PROTEÍNAS G (Effect of taurine on the nucleotide exchange rate of G proteins).

Romo, X.¹, Fernandez, P.¹, Águila, S.², Ortiz S.¹, Rodríguez, F.¹, Soliz C.¹, Vera, S.¹, Acuña, R.¹.

¹Laboratorio de Neurobiología Molecular, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Andres Bello Sede Concepción, Chile. ²Centro de Nanociencias y Nanotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Taurina (Tau) es un aminoácido que no forma parte de proteínas y que se encuentra presente a altas concentraciones en todas las células. Tau juega un rol importante en la neuromodulación y estabilización de membranas celulares. Además este aminoácido participa en diversos sistemas de transducción de señales en los cuales están implicados cAMP, Ca²⁺, PKC, etc, debido a lo cual tiene un efecto en el interior de la célula. Por ejemplo, se ha visto que en algunos tipos celulares Tau estimula la adenilato ciclasa y actúa sobre fosfodiesterasa de cAMP, aumentando los niveles de este segundo mensajero. Por esta razón nosotros investigamos la acción de Tau sobre proteínas G.

Para realizar esto nosotros expresamos y purificamos proteínas G recombinantes (G_{as}, G_{ai2} y G_{aq}) en *E. coli*, y luego hicimos ensayos de intercambio de GDP/GTPγS usando Bodipy[®] FL-GTPγS. Los datos fueron analizados con el software estadístico Graph pad prism5.02.

Nosotros encontramos que Tau es capaz de activar a la proteína G_{as} e inhibir a la proteína G_{aq}, no teniendo ningún efecto sobre la proteína G_{ai2}. Además Tau no potencia el efecto de EtOH sobre la proteína G_{as}. Usando herramientas bioinformáticas, nosotros encontramos algunos aminoácidos candidatos para la interacción con Tau.

Este trabajo es muy importante ya que es la primera vez que se reporta una interacción directa entre Tau y proteínas, además de que abre una ruta no canónica de regulación de la actividad de proteínas G.

Agradecimientos: Proyecto UNAB DI 22-12R

Correo electrónico: xromo@unab.cl

Socio Patrocinante: Farias, J.

P047. EL ÁCIDO LINOLEICO AUMENTA LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN LAS CÉLULAS ENDOTELIALES DE ARTERIA PULMONAR DE BOVINO (CPA-47) (Linoleic Acid increases nitric oxide production in endothelial cells from bovine pulmonary artery).

Loaiza, A.¹, Mena J.¹, Hidalgo MA.¹, Burgos R.¹

¹Laboratorio de Farmacología de la Inflamación. Instituto de Farmacología y Morfofisiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile.

El nivel de los ácidos grasos no esterificados (NEFAs) aumenta en el plasma del ganado bovino durante la etapa de parto, correlacionándose con un incremento en la incidencia de patologías inflamatorias. En nuestro laboratorio, hemos demostrado que los NEFAs son capaces de activar tanto el calcio como el óxido nítrico en las células endoteliales de cordón umbilical de bovino. Sin embargo, no sabemos si el aumento del óxido nítrico está relacionado con las vías de señalización intracelular.

Para evaluar el nivel de calcio intracelular y de óxido nítrico en la línea de células endoteliales CPA-47, estas se incubaron con las sondas fluorescentes Fura-2-AM o DAF-FM, respectivamente. Además, para determinar la procedencia del calcio usamos EGTA y BAPTA-AM como agentes quelantes extracelulares e intracelulares, respectivamente y para dilucidar la participación de las vías de señalización usamos L-NAME, LY294002, UO123 y SB203580, inhibidores de las enzimas: óxido nítrico sintasa, PI3K, MEK1/2 y p38 MAPK. Finalmente, mediante inmunoblot determinamos la fosforilación de p38.

Como resultados obtuvimos que: el ácido linoleico (LA) aumenta de manera sostenida el calcio intracelular en las células CPA-47. Además, detectamos que el incremento del óxido nítrico, ante 5 min. de incubación con 30 μ M de LA, es significativamente dependiente del calcio intracelular y extracelular. Por otro lado, solamente los inhibidores L-NAME y SB203580 disminuyeron de manera significativa el nivel del óxido nítrico. Este último resultado se relaciona con el aumento en la fosforilación de p38 ante LA, según resultados preliminares mediante inmunoblot.

Por lo tanto, nuestros resultados muestran que el ácido linoleico es capaz de activar agudamente a las células endoteliales de arteria pulmonar, lo que podría generar un estado inflamatorio en el lecho vascular.

Agradecimientos: Proyectos Fondecyt: Postdoctorado 3120255, Iniciación 11100413 y Regular 1120718. Dirección de Investigación y Desarrollo, Universidad Austral de Chile.

Correo electrónico: anitsiloaiza@hotmail.com.

Socio Patrocinante: Burgos, R.

P048. ÁCIDO P-CUMÁRICO PROTEGE LA RELAJACIÓN DEPENDIENTE DE ENDOTELIO AFECTADA POR ALTA GLUCOSA EN AORTA DE RATA (*p*-Coumaric acid protects endothelium-dependent relaxation affected by high glucose in rat aorta).

Vinet, R.^{1,2}; Araos, P.^{1,2}; Álvarez, R.¹; Gentina, J.C.³; Knox, M.⁴; Guzmán, L.⁴

¹Laboratorio de Farmacología y Bioquímica, Facultad de Farmacia, Universidad de Valparaíso. ²CREAS, Región de Valparaíso, Chile.

³Escuela de Ingeniería Bioquímica, Facultad de Ingeniería, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. ⁴Laboratorio de Química Biológica, Instituto de Química, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

El ácido p-cumárico (p-CA) es un metabolito ubicuo en plantas, con propiedades antioxidantes, anti-inflamatoria, y anticancerígenas. El presente estudio fue diseñado para evaluar los efectos preventivos de p-CA sobre la relajación dependiente de endotelio, deteriorada por niveles altos de glucosa (HG) (D-glucosa 25 mM) en aorta torácica aislada de rata. Los anillos aórticos obtenidos de ratas macho Sprague-Dawley se montaron en un baño de órganos y fueron pre-tratados durante 3 h con D-glucosa 5 mM, HG, y HG más de p-CA (1, 10 y 100 μ M). Después de este período de tiempo se evaluó la relajación dependiente de endotelio mediante la adición acumulativa de acetilcolina (ACh) en anillos pre-contraídos con fenilefrina (PE) (0,1 μ M). p-CA mostró un moderado efecto vasodilatador dependiente de endotelio ($E_{max} = 29,28 \pm 1,89\%$, $N = 6$; $pD_2 = 6,075 \pm 0,184$, $N = 6$). Cuando los anillos aórticos se pre-incubaron durante 3 h con HG, la E_{max} para ACh se redujo drásticamente desde $87,69 \pm 2,59\%$ ($N = 6$) a $40,54 \pm 1,78\%$ ($N = 6$). El efecto negativo de HG se revirtió parcialmente, de manera dependiente de concentración, en los anillos co-incubados con p-CA tal como lo muestra el valor de E_{max} para cada concentración de p-CA: 1 μ M ($48,57 \pm 1,82\%$), 10 μ M ($60,81 \pm 1,80\%$) y 100 μ M ($64,51 \pm 1,80\%$). La acción de p-CA se asoció con un cambio significativo en la E_{max} . No se observó diferencia estadísticamente significativa en el pD_2 . Nuestros resultados muestran claramente que p-CA protege la relajación dependiente de endotelio inducida por ACh, la cual es afectada por HG en anillos aislados de aorta de rata.

Agradecimientos: Este trabajo fue financiado por los Proyectos (1) DI PIA 037.430/12, P. Universidad Católica de Valparaíso, (2) DIPUV-57/2011, Universidad de Valparaíso, Chile, y (3) Proyecto CREAS CONICYT-REGIONAL, GORE Región de Valparaíso, R12C1001, Chile.

Correo electrónico: raul.vinet@uv.cl

P049. SIMVASTATINA REDUCE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR INDUCIDA POR *TRYPANOSOMA CRUZI* EN UN MODELO DE ACTIVACIÓN ENDOTELIAL (Simvastatin reduce the expression of cell adhesion molecules induced by *Trypanosoma cruzi* in a endothelial activation model).

Campos-Estrada, C.¹, López-Muñoz R.¹, Kemmerling U.², Morello A.¹, Maya JD.¹

¹Programa de Farmacología Clínica y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, U. de Chile. ²Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo, ICBM, Facultad de Medicina, U. de Chile.

La enfermedad de Chagas afecta a 10 millones de personas en América Latina y en 2008, murieron más de 10.000 personas por esta causa. Esta enfermedad es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. El parásito infecta células del sistema inmune y desencadena una respuesta inflamatoria para controlar la replicación del parásito. Si esta respuesta inflamatoria persiste, se da paso a la fase crónica de la enfermedad, que se desarrolla en el 30% de los individuos, en la forma de Cardiopatía Chagásica Crónica (CCC). Durante la infección, el endotelio vascular se activa, aumenta la expresión de moléculas de adhesión celular en el endotelio (E-CAMs) para favorecer el reclutamiento de células inflamatorias. El benznidazol es parte del tratamiento actual de la enfermedad de Chagas, actúa como tripanocida, pero puede presentar graves efectos adversos y no ha demostrado ser eficaz en la fase crónica. Por tanto, mejorar la eficacia de este fármaco, modificando la fisiopatología de la CCC, como la inflamación, es una estrategia muy interesante. Así, se ha descrito que simvastatina, podría reducir la inflamación en el endotelio vascular y el reclutamiento de células inflamatorias, entre otros efectos. Se determinó el IC₅₀ de ambos fármacos en células EA.hy926 y tripomastigotes Dm28c, por la técnica de MTT. Posteriormente se determinó la cinética de expresión de E-CAMs inducida por TNF α y *T. cruzi* en células EA.hy926 y el efecto de simvastatina, benznidazol y posaconazol sobre la expresión de V-CAM 1, I-CAM 1 y E-selectina mediante citometría de flujo e inmunocitofluorescencia. Se evidenció un aumento estadísticamente significativo de la expresión de E-CAMs en células endoteliales inducidas con TNF α e infectadas con *T. cruzi*. Además, simvastatina fue capaz de disminuir la expresión de moléculas de adhesión sin afectar la viabilidad celular. De este modo, simvastatina podría contribuir al tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Agradecimientos: Fondecyt Grant 1130189, CONICYT-PIA Anillo ACT 112.

Correo electrónico: ccampos@cic.uchile.cl

Socio Patrocinante: López-Muñoz, R.

P050. EFECTOS DIRECTOS DE DELFINIDINA Y EXTRACTO DE ARISTOTELIA CHILENSIS (MAQUI) SOBRE CÉLULAS HT-29 E INTESTINO DE RATÓN (Direct effects of delphinidin and Aristotelia Chilensis [maqui] extract over HT-29 cells and mouse intestine).

Hidalgo, J.I.^{1,2}, Cárdenas M.V.¹, Molina A.A.¹, Teuber S.¹, Jara E.¹, Hidalgo M.A.¹, Morera F.J.¹, Flores C.A.³, Burgos R.A.¹

¹Instituto de Farmacología y Morfofisiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. ²Programa de Doctorado en Ciencias Médicas Universidad Austral de Chile. ³Centro de Estudios Científicos (CECS), Valdivia, Chile.

El consumo oral de antocianinas, compuestos polifenólicos presentes en las frutas, se ha relacionado con efectos antidiabéticos en modelos animales y humanos; sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados son poco claros ya que las antocianinas poseen una muy baja biodisponibilidad debido a su escasa absorción. Para evaluar la posibilidad de un efecto local de antocianinas sobre el epitelio intestinal, usamos como modelos de estudio la línea celular humana similar a enterocito HT-29 y preparaciones intestinales *ex-vivo* de ratones C57Bl/6.

Las células HT-29 fueron estimuladas por distintos tiempos con diferentes concentraciones de un extracto del fruto de maqui rico en antocianinas o sólo con delfinidina, la principal antocianidina presente en el extracto, evaluando cambios en la fosforilación de las quinasas relacionadas con el metabolismo energético Akt y Erk 1/2. También se evaluaron mediante fluorimetría los cambios en la concentración intracelular de calcio posterior a un estímulo con delfinidina.

Los estudios con preparaciones intestinales *ex-vivo* fueron llevados a cabo empleando cámaras Ussing para medir el efecto de delfinidina (aplicada por el lado luminal de la preparación) sobre las corrientes de cortocircuito asociadas al transporte electrogénico de glucosa en segmentos de yeyuno de ratón.

Los resultados en células en cultivo mostraron que el extracto de antocianinas y delfinidina son capaces de producir efectos directos sobre las células intestinales, incrementando la fosforilación de Akt y Erk1/2. Los experimentos en cámara de Ussing demostraron que delfinidina inhibe el transporte de glucosa acoplado a sodio en el intestino de ratón. En conjunto, estos resultados sugieren la existencia de un mecanismo de señalización celular gatillado por el extracto de antocianinas y delfinidina en el epitelio intestinal, no necesitando que el compuesto sea absorbido al torrente sanguíneo para ejercer efectos biológicos.

Agradecimientos: Proyecto INNOVA CORFO 12IDL2-16254 y Beca CONICYT 21130644.

Correo electrónico: ji.hidalgo.godoy@gmail.com

P051. EL ÁCIDO LIPOTEICÓICO DE *B.SUBTILIS* MODULA LA EXPRESIÓN DE NGF Y UCN II EN CÉLULAS EPITELIALES DE COLON HUMANO (Lipoteichoic acid from *B. subtilis* modulates the expression of NGF and Ucn II in human colon epithelial cells).

González-Arancibia, C.¹, Díaz-Merino C.¹, Realini O.¹, Gotteland M.², Julio-Pieper M.¹, Bravo J.A.¹

¹Grupo de NeuroGastroBioquímica, Laboratorio de Química Biológica, Instituto de Química, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. ²Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago.

Se ha demostrado que intervenciones en la microbiota intestinal afectan la conducta de animales y voluntarios sanos. Esto es lo que hoy en día se reconoce como eje microbiota-intestino-cerebro. Sin embargo las vías de conversación entre bacterias y células de mamífero no han sido totalmente dilucidadas.

La microbiota intestinal la compone un gran número de microorganismos, incluyendo a bacterias gram-positivas, las que se caracterizan por tener ácido lipoteicóico (LTA) como componente de su pared celular. El LTA es reconocido por el receptor tipo toll 2 (TLR2) que se expresa en la superficie de las células epiteliales de colon humano. Por otro lado, se ha demostrado que en el intestino, las células epiteliales de colon, que están en mayor proximidad con la microbiota, son capaces de producir neuropéptidos, como el factor de crecimiento nervioso (NGF) y la Urocortina II (Ucn II), que ejercen efectos sobre células nerviosas y que, en el intestino, son capaces de modular la respuesta anti-inflamatoria, la nocicepción visceral y el vaciamiento gástrico. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto del LTA de *Bacillus subtilis* (LTA-BS) sobre la expresión de neuropéptidos en células CACO2, línea celular correspondiente a epitelio de colon humano.

La estimulación de estas células con distintas concentraciones de LTA-BS (0,1; 1,0; 10,0 µg/ml) disminuye la expresión de mRNA de NGF y UcnII, sin afectar la expresión de mRNA del receptor TLR2. Así, estos resultados sugieren que el LTA de bacterias gram-positivas afecta la expresión de neuropéptidos, como NGF y UcnII en células epiteliales de colon humano, y por lo tanto permite establecer una de las posibles vías de comunicación entre bacterias y neuronas. Esta comunicación, mediada por cambios en NGF y Ucn II, podría ser uno de los efectos beneficiosos de bacterias con potencial probiótico.

Agradecimientos: PUCV DI 037.499/2013, PUCV DI 037.302/2013 y Fondecyt 1130213

Correo electrónico: javier.bravo@ucv.cl

Socio Patrocinante: Sotomayor-Zárate, R.

P052. ACTIVACIÓN DE TLR-3 Y FUNCIÓN BARRERA INTESTINAL (TLR-3 activation and Intestinal Barrier Function)

Moyano-Porcile, V.¹, Bravo J.A.¹, Julio-Pieper M.¹

¹Grupo de NeuroGastroBioquímica, Laboratorio de Química Biológica, Instituto de Química, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile.

El intestino constituye una barrera biológica que permite el tránsito selectivo de nutrientes y al mismo tiempo restringe el ingreso de elementos patogénicos. Alteraciones en la función barrera han sido evidenciadas en paralelo a enfermedades crónicas o durante el curso de lesiones por traumatismos e infecciones agudas. Una pregunta que aún genera controversia es si el daño en la barrera intestinal es una causa o consecuencia de dichas patologías. Al mismo tiempo, los mecanismos relacionados a la fisiopatología de las alteraciones en la función barrera no son del todo conocidos.

El receptor tipo toll 3 (TLR-3) es un receptor de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos, particularmente RNA de doble hebra. La activación de TLR-3 produce efectos adversos en células del epitelio nasal como en la barrera hematoencefálica. Aunque existen reportes sobre la activación del receptor TLR-3 y su efecto nocivo en el intestino, la información acerca de los mecanismos de acción en células epiteliales es insuficiente y se desconoce si la activación del TLR-3 podría generar perturbaciones en la función barrera.

Para evaluar los efectos de la activación de TLR-3 en la función barrera intestinal, se utilizó el ligando artificial poly(I:C) en un modelo de permeabilidad ex-vivo, en el cual se midió el tráfico de marcadores fluorescentes a través de la pared intestinal. Luego, en el mismo tejido se evaluó la expresión de mRNA de las proteínas de unión estrecha Occludina y Zonula Occludens 1. Luego de 120 minutos de incubación del tejido con concentraciones de 0, 0,5, 5 y 50 µg/mL de poly (I:C), se observó una tendencia no significativa de disminución en la permeabilidad del colon a ambos marcadores fluorescentes. Por otra parte, a los 120 minutos, los niveles de expresión de mRNA de las dos proteínas de unión estrecha no variaron significativamente al estimular con las diferentes concentraciones. Estos resultados sugieren que los posibles efectos de la activación de TLR-3 en la función barrera podrían evidenciarse a dosis y/o tiempos mayores de incubación con respecto a los ensayados.

Agradecimientos: Conicyt 79112017, Fondecyt 1130213, PUCV DI 037.302/2013

Correo electrónico: marcela.julio@ucv.cl

Socio Patrocinante: Sotomayor-Zárate, R.

P053. REGULACION TEMPORAL Y EXPRESION DIFERENCIAL DE LOS TRANSPORTADORES DE VITAMINA C EN HIGADO DE RATA POST HEPATECTOMIA PARCIAL (Temporal changes of vitamina C transporter expression in rat liver post partial hepatectomy).

Maldonado, M.¹, Moncada N.¹, Mardones L.³, Peña E.¹, Muñoz A.¹, Rivas C.I.¹ y Vera J.C.¹

¹Laboratorio de Antioxidantes, Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

²Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Católica de la Santísima Concepción.

La vitamina C (ácido ascórbico) es un potente antioxidante esencial para la sobrevivencia de las células y participa en la defensa contra toxinas y radicales libres. El hígado cumple una función detoxificadora central y posee una capacidad regenerativa que se manifiesta después de una lesión aguda. En ratas, la hepatectomía del 70% del hígado es seguida de hiperplasia compensadora, aumento de la resistencia a hepatotoxinas y recuperación de la función hepática en 5 a 7 días.

En este trabajo analizamos si durante la regeneración hepática post-hepatectomía parcial en ratas, se modifica el metabolismo de la vitamina C. En muestras de hígado obtenidos desde la hora cero hasta 7 días post-hepatectomía parcial, establecimos la cinética temporal de la expresión de los transportadores de ácido ascórbico, SVCT1 y SVCT2, por inmunohistoquímica, y en ensayos paralelos determinamos las características del transporte de ¹⁴C-ácido ascórbico en cultivos primarios de hepatocitos recién aislados.

Hepatocitos de ratas controles expresan solo el transportador SVCT1, con ausencia de SVCT2. Sin embargo, hepatocitos post-hepatectomía parcial regulan diferencialmente la expresión de SVCT1 y SVCT2 a nivel de proteína. SVCT1 es indetectable dentro de dos horas post-hepatectomía, para recuperar su nivel de expresión en los siguientes siete días a partir del día dos; por su parte, SVCT2 es claramente detectable ya al día uno post-hepatectomía, manteniendo su expresión hasta el día siete. Los ensayos de transporte demostraron que hepatocitos controles expresan un único transportador de ácido ascórbico con propiedades cinéticas compatibles con SVCT1. Post-hepatectomía parcial, los hepatocitos presentan una marcada disminución en la velocidad de transporte de ácido ascórbico, sin que se observe recuperación total al día siete. Nuestros resultados indican que durante la regeneración post-hepatectomía parcial, existe una expresión diferencial, regulada temporalmente, de los transportadores de vitamina C, cambios que modifican la capacidad del hígado de metabolizar vitamina C.

Agradecimientos: Beca de Apoyo de Tesis Doctoral 24121185, Proyectos Fondecyt 1090501 y 1130842.

Correo electrónico: mmaldona@udec.cl

Socio Patrocinante: Vera, J.C.

P054. ESTATINAS DESREGULAN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE microRNAs IN VITRO (Statins deregulate the microRNA expression profile *in vitro*).

Zambrano, T.^{1,2}, Hirata RD², Hirata M², Cerda A², Salazar LA¹.

¹Centro de Biología Molecular & Farmacogenética, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco; ²Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brasil.

Las estatinas son fármacos que se utilizan ampliamente para el tratamiento de la hipercolesterolemia y la reducción del riesgo cardiovascular. Ha sido demostrado, en diferentes modelos celulares, que las estatinas modifican la expresión de genes implicados en la homeostasis del colesterol. Sin embargo, no existen antecedentes sobre el control post-transcripcional ejercido por pequeños RNA no codificantes, llamados microRNAs (miRNAs), en la regulación del colesterol, especialmente en respuesta a estatinas. Así, en el presente estudio se investigó el efecto de atorvastatina y simvastatina sobre el perfil de expresión de microRNAs *in vitro*. Se evaluó el perfil de expresión de 2.019 miRNAs en células de linaje hepático - HepG2, tratadas con 10 µM de simvastatina o atorvastatina e incubadas por 24 horas; utilizando el Biochip µParaflo® (LC Sciences, EE.UU.). La normalización de los niveles de expresión se realizó mediante el método LOWESS. El tratamiento de las células HepG2 con simvastatina modificó diferencialmente la expresión de 9 microRNAs, mientras que la atorvastatina modificó el perfil de expresión de 35 microRNAs. En común, ambas estatinas modificaron la expresión de sólo dos microRNAs (hsa-miR-4485 y hsa-miR-6510-5p). Estos microRNAs diferencialmente expresados pueden constituir potenciales biomarcadores para evaluar la respuesta a estatinas o futuras dianas terapéuticas. Sin embargo, nuestros hallazgos deben ser confirmados *in vivo*.

Agradecimientos: Beca CONICYT Doctorado Nacional (N° 21090417), Proyectos FAPESP (N° 2011/21967-1), CNPq (N° 473485/2012-5) & FONDECYT (N° 1130675).

Correo electrónico: luis.salazar@ufroterra.cl

P055. VASCULAR REACTIVITY OF HUMAN PLACENTA FROM GESTATIONAL DIABETES MELLITUS PREGNANCIES, IN RESPONSE TO U46619 AND INSULIN.

Valdivia, L.¹, Rojas S¹, Cid M², González M.¹

¹Laboratorio de Fisiología Vascular, Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile. P.O. Box 160-C, Concepción, Chile. ²Departamento de Obstetricia y Puericultura, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción, Chile. P.O. Box 160-C, Concepción, Chile.

Gestational diabetes mellitus (GDM) has been associated with fetoplacental vascular dysfunction, a condition associated with changes in vascular responses to different agonist. U46619 (the analog of thromboxane A₂) and insulin changes the vascular tone in normal placenta in different ways. U46619 increases the perfusion pressure and insulin decrease the contraction in fetoplacental vasculature. The effects of these agonist in GDM placenta is unknown. Aim: To determine vascular reactivity in placental circulation from GDM in response to U46619 and insulin. Methods: A suitable fetal vein and artery pair on the surface of the chorionic plate of normal and GDM placenta (ethics committee approval and informed patient consent were obtained), leading to a peripheral cotyledon, were cannulated. Each cotyledon was perfused with a Krebs solution, continuously gassed with 95% O₂ and 5% CO₂ (pH 7-4) at 37°C, constant flow rate. After stabilization, the effects of U46619 and/or insulin on perfusion pressure or flow were determined. Results: In normal placenta U46619 increase the perfusion pressure without change in flow, with half maximal effective concentration (EC₅₀) of 1.04 nM and maximal effect of 186% compared with basal perfusion pressure. In GDM placenta, U46619 increased 2.3-fold the perfusion pressure. Vasodilatation induced by 1 nM insulin is lower (27%) in placenta from GDM patients. Conclusion: There is an increase of vasoconstriction induced by U46619 in placenta from pregnancies with GDM, but lower vasodilation in response to insulin. In GDM is necessary higher concentration of insulin to induce a vasorelaxation similar to normal tissue.

Financial Support: FONDECYT 11100192

P056. EFECTO DE LA HORMONA TIROIDEA (T₃) EN LA FOSFORILACION DE BLANCOS DE AMPK EN RELACION AL METABOLISMO LIPIDICO EN HIGADO DE RATAS (Effect of thyroid hormone (T₃) administration in the phosphorylation status of key AMPK targets related to lipid metabolism in rat liver).

Vargas, R.¹; Cornejo P²; Fernández V¹; Videla L.A.¹.

¹Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. ²Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Medicina, Universidad Diego Portales.

El preacondicionamiento hepático, inducido por la administración de L-3,3',5-triiodotironina (T₃), gatilla respuestas adaptativas que conllevan a una elevada demanda energética. En este contexto, se ha propuesto que la activación de la vía de señalización regulada por la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) promueve la producción de ATP apoyando energéticamente dichas demandas energéticas. Considerando que dichos efectos pueden ser mediados por incrementos en el metabolismo lipídico, en este estudio se evalúa cambios en el estado de fosforilación de AMPK (Westernblot) y Acetil-CoA carboxilasa (ACC), CREB y PGC-1α, proteínas blanco de AMPK (ELISA), luego de la administración de una dosis de T₃ (0,1 mg/kg, i.p.) a ratas machos Sprague Dawley. Las muestras hepáticas fueron obtenidas 24 hrs post-T₃ o su vehículo (controles). T₃ aumentó significativamente (p<0,05) los niveles citoplasmáticos de AMPK fosforilada (pAMPK) y los de ACC, CREB y PGC-1α, observándose en paralelo un aumento en la expresión de los mRNA (qPCR) de dichas proteínas blanco de AMPK. Se concluye que la activación de la vía de señalización de AMPK, vía fosforilación, gatilla una mayor actividad de la vía regulada por AMPK determinando una mayor actividad oxidativa de lípidos y el estado energético celular.

Agradecimientos: Financiado por FONDECYT 1120034

Correo electrónico: rominavargas@med.uchile.cl

Socio Patrocinante: Videla, L.A.

P057. EXPRESIÓN DE DIFERENTES ISOFORMAS DE ACETILCOLINESTERASA EN OVARIO DE RATA (Expression of acetylcholinesterase isoforms in the rat ovary).

Urra, J.¹, Blohberger J², Mayerhofer A², Lara H¹.

¹ Laboratorio de Neurobioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. ² Anatomy III - Cell Biology, Ludwig Maximilian University, Munich, Alemania.

Varias evidencias indican la existencia de un sistema colinérgico local en el folículo ovárico, sin embargo el papel que este estaría jugando permanece aún desconocido. Las células de la granulosa producen acetilcolina (ACh) y su acción autocrina es mediada por receptores muscarínicos y calcio intracelular. La biodisponibilidad de ACh está regulada por la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), cuya presencia se ha documentado en los distintos compartimientos ováricos (fibras nerviosas, folículos y cuerpo lúteo) mediante la utilización de técnicas histoquímicas. AChE es una proteína multifuncional de la cual se han descrito 3 isoformas por splicing de su pre mRNA: las variantes sináptica (S), eritrocitaria (E) y "readthrough (R)", que se diferencian por sus localizaciones intracelulares, capacidad para formar multímeros, y su interacción con membranas. No se conoce cual o cuales de las isoformas de AChE están presentes en el ovario.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión de las diferentes isoformas conocidas para AChE en ovario de rata adulta utilizando técnicas de RT-PCR, Western Blot, ensayos de actividad enzimática e inmunohistoquímica.

Se demostró la presencia de las isoformas S y "readthrough", con una localización en distintos tipos de folículos además del cuerpo lúteo y vasos sanguíneos. Esta distribución sugiere la existencia de una regulación local de los niveles de ACh en el folículo ovárico durante el desarrollo. Sin embargo, la expresión de más de una isoforma de AChE podría estar relacionada con las propiedades no-enzimáticas descritas en órganos no-neuronales, tales como proliferación, diferenciación y apoptosis. De ser así, este sistema podría participar en procesos finamente regulados en el ovario como desarrollo folicular y ovulación y participar en el desarrollo y mantención de patologías como el síndrome del ovario poliquístico (PCOS) el cual se caracteriza por cambios importantes en el desarrollo folicular y en la síntesis de esteroides.

Agradecimientos: Financiado por Proyecto PIA-DFG-Conicyt 10.

Correo electrónico: jeivieru@gmail.com

P058. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN LOCAL DE KISSPEPTINA EN EL OVARIO DE RATA SOBRE EL DESARROLLO FOLICULAR Y OVULACIÓN (Effect of local administration of kisspeptin in the ovary on the follicular development and ovulation).

Leandro Contreras¹, Favian Uribe¹, Gonzalo Cruz^{1,2}, Manuel Ricu² y Hernán E Lara²

¹Centro de Neurobiología y Plasticidad Cerebral (CNPC), Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso. Laboratorio de Neurobioquímica, ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Kisspeptina es un péptido reconocido actualmente como un regulador maestro del eje hipotálamo hipófisis-ovario. Neuronas kisspeptidérgicas ubicadas en los núcleos paraventricular y arcuato del hipotálamo controlan tanto la liberación tónica como el pico preovulatorio de GnRH participando así en la ciclicidad estral y en el inicio de la pubertad en la rata y otras especies. Sin embargo, varios tejidos periféricos expresan kisspeptina y su receptor GPR54, entre ellos el ovario. Recientemente demostramos que la administración local de un antagonista de GPR54 en ovario retrasa la pubertad en la rata dando indicios de un posible enlentecimiento del desarrollo folicular. En este trabajo nos planteamos medir el efecto de la administración local de kisspeptina simulando un incremento en los niveles producidos en forma paracrina en el ovario. 15 ratas de la cepa sprague dawley fueron divididas en 3 grupos: Control, al que se administro suero fisiológico mediante una bomba osmótica intraovárica por 28 días, Kiss 7 y Kiss 28, a los que se administro kisspeptina en suero fisiológico mediante el mismo procedimiento por 7 y 28 días respectivamente. Terminado el tratamiento se procedió a eutanasia y recolección de tejidos. Los ovarios fueron procesados por la técnica histológica de rutina y teñidos con hematoxilina-eosina, para realizar el recuento de folículos y cuerpos lúteos. Encontramos que la administración de kisspeptina produjo un incremento en la cantidad de folículos antrales sanos sin disminución de los atrésicos, lo que es coherente con un incremento en el reclutamiento de folículos. Adicionalmente, kisspeptina produce un incremento en la cantidad de cuerpos lúteos indicando que estos folículos reclutados ovulan. Nuestros resultados muestran que kisspeptina favorece el desarrollo folicular y podría potencialmente considerarse como una alternativa terapéutica en el tratamiento de la infertilidad.

Agradecimientos: Financiamiento: Fondecyt 1130049 (H.L)

Correo electrónico: setzer_gabianni2@hotmail.com

Socio Patrocinante: Lara, H.E.

P059. RESPUESTA ANTI-INFLAMATORIA EN EL PREACONDICIONAMIENTO CON HIERRO FRENTE A LA ISQUEMIA-REPERFUSIÓN HEPÁTICA: PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO TRANSIENTE (Anti-inflammatory response in iron preconditioning against liver ischemia-reperfusion: role of transient oxidative stress).

Bastías, D.; Fernández V; Videla L.A.

Laboratorio de estrés oxidativo y hepatotoxicidad, Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Introducción: La administración de hierro (Fe) subcrónico precondiciona al hígado (PFe) frente a la isquemia reperusión (IR), mediante la inducción de un estrés oxidativo transitorio (EOXT), gatillado por el pool de Fe lábil. Durante este periodo las células de Kupffer son activadas liberando citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). La administración del antioxidante N-acetil cisteína (NAC) previo al Fe elimina el EOXT y el PFe. En este estudio se evalúa el efecto de la eliminación del EOXT sobre la respuesta anti-inflamatoria inducida por el PFe, a través de cambios en los contenidos sérico y hepático de TNF- α .

Materiales y Métodos: Ratas macho Sprague Dawley, recibieron 1g/kg de NAC i.p., 30 minutos antes de cada dosis de Fe (50 mg/Kg; 6 dosis en días alternados), y fueron sometidas a IR (1 h isquemia y 20 h reperusión). Al término de la IR se recolectó muestras séricas y hepáticas (lóbulo isquemizado). El TNF- α sérico y el contenido hepático de esta citoquina fueron evaluados mediante ELISA.

Resultados: La IR incrementó significativamente ($p < 0,05$) los niveles séricos de TNF- α (67%) y el contenido hepático de la citoquina (27,2%), efectos que no se observan en los animales sometidos a PFe, en los cuales los valores séricos y hepáticos del TNF- α son similares a sus controles, señalando que el efecto hepatoprotector del Fe es mediado por la inducción de una respuesta anti-inflamatoria. El efecto anti-inflamatorio del PFe no se observa en animales pretratados con NAC, en los cuales tanto el TNF- α sérico como el hepático se mantienen elevados ($p < 0,05$) en relación a sus controles (60% y 70%, respectivamente).

Se concluye que la respuesta anti-inflamatoria gatillada por el PFe es dependiente del EOXT inducido por el micronutriente.

Agradecimientos: Proyecto FONDECYT 1110006

Correo electrónico: danielpatias@gmail.com

Socio Patrocinante: Fernández, V.

P060. MARCADORES PLASMÁTICOS DE ESTRÉS OXIDATIVO E HIPOXIA EN RATAS SOMETIDAS A HIPOXIA CRÓNICA INTERMITENTE (Plasma markers of oxidative stress and hypoxia in rats subjected to chronic intermittent hypoxia).

Arias, C.¹, Zepeda A.^{1,2}, Figueroa C.^{1,2}, Pessoa jr A.², Pulgar V.M.^{3,4}, Mardones L.A.⁵, Castillo R.L.⁵, Farías J.G.¹

¹Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química, Ciencias y Administración, Universidad de La Frontera, Casilla 54-D, Temuco, Chile. ²Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580 – Bloco 16, São Paulo, SP, 05508-900, Brazil. ³Biomedical Research Infrastructure Center, Winston-Salem State University. ⁴Department of Obstetrics and Gynecology, Wake Forest School of Medicine, Winston Salem, NC, USA. ⁵Pathophysiology Program, Institute of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, University of Chile, Santiago, Chile.

En una condición de altura, se genera hipoxia por baja tensión de oxígeno (hipobaria). En este contexto, una serie de mediadores como el factor inducible por hipoxia tipo 1 α (HIF-1 α), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y las especies reactivas del oxígeno (ERO) están involucrados en los mecanismos de daño tisular. El propósito del estudio fue determinar los niveles de HIF-1 α , VEGF y biomarcadores de estrés oxidativo en un modelo de ratas sometidas a hipoxia hipobárica crónica intermitente (HHCI). Ratas Wistar macho fueron expuestas a HHCI (96 h de hipoxia seguida de 96-horas de normoxia normobárica, n=10). Como control se utilizaron 10 ratas en condición de normoxia normobaria (Nx). Se tomaron muestras de sangre en la condición basal (día 0) y al día 15. Se determinaron los niveles plasmáticos de HIF-1 α , capacidad antioxidante total (FRAP), carbonilos totales y VEGF en el plasma. Los resultados muestran que los valores de HIF-1 α fueron mayores en el grupo de ratas hipóxicas comparadas con los valores en el grupo normóxico ($p < .05$), al día 15. Por el contrario, los niveles plasmáticos de VEGF fueron más bajos en este grupo sometido a HHCI ($p < .05$). Por otra parte, los valores de FRAP y carbonilos fueron mayores al día 15, comparados con los valores basales ($p < .01$). Podemos concluir que los niveles plasmáticos de HIF-1 α y VEGF se pueden utilizar como marcadores tempranos de la respuesta celular a la HHCI. Esta respuesta se asociaría a la inducción de estrés oxidativo.

Agradecimientos: FAPESP 12/50210-9 (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brasil; Proceso:), International Cooperation Program of Universidad de La Frontera DI12-4001 and DIUFRO grant DI12-2007.

Correo electrónico: consuelo.arias@gmail.com

P061. PAPEL CAUSAL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA QUINASA ACTIVADA POR AMP (AMPK) HEPÁTICA EN RATAS TRATADAS CON HORMONA TIROIDEA (T_3) (Role of T_3 - induced oxidative stress in liver expression of AMP-activated protein kinase (AMPK)).

Cornejo, P.¹; Vargas, R.² Fernández, V.², Escobar O.³, Escudero N.³, Fischer A.³, Videla, LA.².

¹Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Medicina, Universidad Diego Portales. ²Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. ³Escuela de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La administración de T_3 conduce a estrés oxidativo (EOx) hepático mediado por la calorogénesis tiroidea, modulando distintas vías sensibles al estado redox. AMPK es un sensor del estado energético celular, regulada por alosterismo (AMP) y por fosforilación reversible en la treonina 172 de la subunidad catalítica α por distintas proteínas quinasas tales como TAK1, CaMKK β y LKB1. El objetivo de este estudio es determinar el papel del EOx en la activación y/o expresión de AMPK en hígado de rata por la administración de T_3 y determinar su correlación con la expresión de TAK1. Para esto los animales fueron pretratados 0,5 horas antes de la administración con T_3 (0,1 mg/Kg de peso) con el antioxidante N-acetilcisteína (NAC) 0,5 g/Kg. La fosforilación de AMPK se determinó con un kit ELISA AMPK α [pT172], los niveles de mRNA de AMPK y TAK1 se determinaron por qPCR. La administración de T_3 por 24 horas produjo un incremento de 89% en los niveles de AMPK fosforilada en comparación con los controles ($p<0,05$), efecto que no es alterado con el pretratamiento con NAC. Por otra parte, se observó aumento de 6,5 veces en los niveles de mRNA de AMPK (qPCR) luego de 24 horas de tratamiento con la hormona en comparación con los controles, efecto suprimido por la administración de NAC. Se determinó el efecto sobre los niveles de mRNA de TAK1, observándose un incremento estadísticamente significativo en la expresión de TAK1 después de 24 horas de tratamiento con T_3 comparado con los valores controles (13,4 veces, $p<0,05$), efecto parcialmente suprimido en los animales que fueron pretratados con NAC ($p<0,05$). Se concluye que el incremento en la expresión de AMPK hepática inducida por T_3 está mediado por un mecanismo redox al cual podría contribuir el aumento en la expresión de TAK1.

Agradecimientos: Financiado por FONDECYT 1120034.

Correo electrónico: pamela.cornejo@udp.cl

P062. ESTRÉS OXIDATIVO Y DISFUNCIÓN HEPÁTICA EN RATONES HEMBRAS ADULTAS CON HÍGADO GRASO EXPERIMENTAL (Oxidative stress and hepatic dysfunction in adult female mice with experimental fatty liver).

López-Ortega, A.A.¹; Aranguren, A.J.¹; Plaza, M.A.²; Murillo, M.D.²

¹Unidad Investigación Cs Funcionales Dr. H. Moussatché, Decanato de Ciencias Veterinarias, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto, Venezuela. ²Departamento Farmacología y Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España.

El estrés oxidativo (EO) afecta la progresión y severidad de diferentes patologías, entre las cuales se incluyen las hepáticas. Ha sido señalada su intervención en el hígado graso (HG) no alcohólico, de relevante importancia tanto en medicina humana como veterinaria debido, entre otras, a la alteración de las funciones hepáticas causada por el deterioro celular producto del EO, como es el proceso de lipoperoxidación. El objetivo de este estudio fue determinar el EO hepático, en el HG experimental inducido por etionina (7,5 mg/20 g peso corporal) de conocida acción hepatotóxica. Se utilizaron 20 ratones hembras NMRI adultas provenientes del Bioterio Central-UCLA. Se formaron dos grupos de 10 animales: uno control y otro tratado con DL-etionina, seguido de un ayuno de 48 horas. El HG evaluado por métodos histológicos y mediante la cuantificación de los triglicéridos hepáticos, indicaron hepatoesteatosis en las hembras inyectadas con etionina. La concentración de malondialdehído (MDA) y de dienos conjugados (DC) se determinó en el hígado por procedimiento espectrofotométrico. Además, en muestras de plasma se cuantificó la concentración de las transaminasas ALT y AST a través de kit comercial. Los datos se expresaron como la media $\pm$ ES; la significación estadística se determinó mediante la prueba "t" de Student ($P<0,05$). La inducción de HG causó elevación significativa de los parámetros de EO hepático, MDA: 258,30 $\pm$ 22,49 nmoles/mg proteínas a 354,90 $\pm$ 19,83 nmoles/mg proteínas ($P<0,005$), como así mismo los DC: 212,46 $\pm$ 8,36 μ moles/mg proteínas a 263,93 $\pm$ 14,51 μ moles/mg proteínas ($P<0,008$). En el HG, la concentración plasmática de las transaminasas aumentó significativamente: ALT (77,01 $\pm$ 4,11 U/l a 198,34 $\pm$ 17,22 U/l; $P<0,001$) y AST (188,29 $\pm$ 11,81 U/l a 401,71 $\pm$ 22,42 U/l; $P<0,001$). Se concluye que el HG inducido por etionina se acompaña con un estado de EO que compromete la funcionalidad hepática. El uso de antioxidantes constituiría una herramienta terapéutica importante. Palabras clave: Hígado graso, etionina, estrés oxidativo, disfunción

Correo electrónico: alopez@ucla.edu.ve

P063. NORMALIZACION DEL ESTADO REDOX HEPATICO EN EL PREACONDICIONAMIENTO FRENTE AL DAÑO POR ISQUEMIA REPERFUSIÓN (IR), INDUCIDO POR UN TRATAMIENTO CONJUNTO CON HIERRO (FE) Y L-3,3'-5-TRIYODOTIRONINA (T₃) (Normalizarion of liver oxidative stress in combined iron (Fe) and L-3,3'-5-triyodotironine (T₃) preconditioning protocol against ischemia reperfusion injury).

Castillo, V.; Vargas, R.; Pedemonte, J.C.; Fernández, V.

Laboratorio de Estrés Oxidativo y Hepatotoxicidad, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Patrocinio Fernández V.

La administración conjunta de Fe y T₃ preconditiona al hígado de rata frente a la isquemia-reperfusión (IR), resultado del estrés oxidativo (EO) transiente y activación de vías citoprotectoras redox sensibles, inducidos por ambos agentes. La IR hepática induce EO drástico que conlleva a disfunción y daño irreversibles. Considerando que el EO drástico es reducido en el preconditionamiento hepático, inducido por T₃ (0,1mg/kg, una dosis) o Fe subcrónico (50mg/kg, seis dosis), se evaluó la normalización del estado redox hepático en el preconditionamiento conjunto con Fe y T₃ en ratas suplementadas con Fe (50mg/kg ip, días 1 y 3) o solución salina (control) seguido de T₃ (0,05mg/kg ip, día 5) o su solvente (NaOH 0,1N). La IR (1 hora de isquemia y 20 hrs. de reperfusión) o cirugía sham (laparotomía sin isquemia) se realizaron el día 7 y las muestras hepáticas se extrajeron el día 8, conformando los grupos (i) salino-NaOH-sham; (ii) salino-NaOH-IR; (iii) salino-T₃-sham; (iv) salino-T₃-IR; (5) Fe-NaOH-sham; (vi) Fe-NaOH-IR; (vii) Fe-T₃-sham; (viii) Fe-T₃-IR. Como parámetros de EO se evaluó (a) relación contenidos de proteínas oxidadas y glutatión total (POX/GSH) y (b) niveles de isoprostanos (promedios $\pm$ SEM, n = 3-12). La necrosis hepática observada en el grupo salino-NaOH-IR (niveles séricos de GOT y GPT), fue acompañada de incrementos significativos (p<0.05) en el contenido de isoprostanos y relación POX/GSH hepáticos, efectos deletéreos que no fueron eliminados por la administración de Fe o T₃ (grupos iv y vi). Sin embargo la normalización de GOT y GPT séricas, inducida por el protocolo combinado Fe/T₃ (grupo viii), fue concomitante con la reducción significativa del contenido de isoprostanos y relación POX/GSH hepáticos, señalando la eliminación del EO drástico inducido por la IR. Se concluye que la normalización del estado redox hepático, incrementado por la IR, media el efecto hepatoprotector del protocolo combinado Fe/T₃.

Agradecimientos: FONDECYT 1110006

P064. EVALUACIÓN DEL EFECTO VASCULAR DE LAS PROANTOCIANIDINAS (PAS) DE EXTRACTOS DE SEMILLAS Y DE PIEL DE UVA PAÍS EN VENAS CORIÓNICAS HUMANAS (Evaluation of the vascular effect of proanthocyanidins (PAs) from seed and skin *País* grape extracts in human chorionic vein).

Grandón, R.¹, González M.¹ y Fernández K.²

¹Laboratorio de Fisiología Vascular, Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile. ²Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad de Concepción.

Las proantocianidinas (PAs) de piel y semillas de uva se han asociado con la inhibición de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) *in vitro*. En este estudio, se evaluó el efecto del grado medio de polimerización (mDP) de las PAs de semillas y piel de uva *País* en la relajación vascular de venas coriónicas humanas. La purificación de los extractos se llevó a cabo con un medio de exclusión de tamaño [TSK Toyopearl HW-40 (F)] para obtener fracciones ricas PAs de semillas y piel de uva *País* (Quillón, Chile). Para la caracterización química, las fracciones se sometieron a la degradación por catálisis ácida en presencia de floroglucinol y su posterior análisis por RP-HPLC. La reactividad vascular se evaluó en un Miógrafo empleando anillos de vena coriónica humana, en la presencia de análogo del tromboxano A2 (U46619) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Un total de nueve fracciones purificadas (F1S a F6S para semillas y F4P a F6P para piel) se obtuvieron y caracterizaron. Las fracciones de PAs tuvieron un mDP que va de 2 a 17 unidades en semillas y de 7 a 49 en pieles. El tratamiento previo de las venas coriónicas humanas con F5P y F6P (100 mM) disminuyó significativamente (p <0,05) la vasoconstricción de las venas coriónica en presencia de U46619 (33% y 78%, respectivamente) o H₂O₂ (86% y 81%, respectivamente), en comparación al control. Nuestros resultados mostraron que los efectos protectores vasculares de los extractos de semillas y pieles de la uva *País* se relacionaron positivamente con su mDP. Fracciones poliméricas piel (F5P y F6P) podrían ser de interés como un potencial fitofármaco antihipertensivo.

Agradecimientos: Proyectos Fondecyt N° 1120148 y N° 11100192.

Correo electrónico: rubengrandon@udec.cl

Socio Patrocinante: González, M.

P065. PRESENCIA DE FLAVONOIDES Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE EXTRACTOS POLARES DE *AZORELLA COMPACTA* (Phil. 1891)
(Presence of flavonoids and biological evaluation of polar extracts from *Azorella compacta* (Phil. 1891)).

Garrido, G.; Astudillo, L.; Pozo, P.

Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Universidad Católica del Norte, Angamos 0610, Antofagasta, Chile.

El presente estudio reporta la actividad antioxidante e inhibitoria de α -amilasa salival de diferentes extractos de *Azorella compacta* (Phil.) utilizando métodos de maceración (polaridad creciente), decocción e infusión. Se realizó la determinación de fenoles y flavonoides totales, la identificación cualitativa de flavonoides, la actividad antioxidante y la actividad sobre α -amilasa. Los extractos que presentaron la mayor cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides fueron: metanol/agua (50:50) (MeOH 50%) > infusión > decocción. La identificación cualitativa de los flavonoides arrojó la presencia de flavonas, flavonoles y flavanonas. Se determinó la actividad antioxidante por parte de todos los extractos seleccionados mediante el secuestro del radical DPPH con CE_{50} mayores para decocción > infusión > MeOH (50%), sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p > 0,05$). La actividad de los extractos sobre α -amilasa salival se determinó por el método yodo-almidón (I_2/KI) en el que se midió la disminución del color violeta producto de la hidrólisis de almidón. Además, se procedió a medir las absorbancias de los distintos extractos en presencia de almidón y I_2/KI por separado, con respecto a las absorbancias del extracto solo. La decocción presentó inhibición de α -amilasa, además de diferencias significativas ($p < 0,05$) en presencia de almidón y I_2/KI en relación al extracto solo. La infusión y MeOH 50% también presentaron inhibición de α -amilasa pero no diferencias significativas ($p > 0,05$) en presencia almidón y I_2/KI en relación al extracto solo.

Este trabajo demuestra la presencia de fenoles y flavonoides totales, así como la actividad antioxidante e inhibitoria de alfa amilasa salival de los extractos acuosos de *A. compacta*, especie que crece en el desierto de Atacama, Antofagasta, Chile. De esta forma se contribuye a la validación del uso popular de esta especie.

Agradecimientos: Proyecto UCN3315-2010

Correo electrónico: gabinocl@yahoo.com

P066. TAMIZAJE FARMACOLÓGICO Y PRESENCIA DE FLAVONOIDES EN DIFERENTES EXTRACTOS DE *TAGETES MINUTA* LINNEO CON ACTIVIDADES ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA
(Pharmacological screening and the presence of flavonoids in different extracts of *Tagetes minuta* Linneo as antioxidant and antimicrobial activities).

Garrido, G.; Carrasco, H.; Pozo, P.

Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Universidad Católica del Norte, Angamos 0610, Antofagasta, Chile.

Tagetes minuta L., conocida como 'suico', es una planta que crece en zonas consideradas críticas, cuyo clima desértico, temperaturas bajas y aire seco favorecen el desarrollo de esta especie vegetal. En la medicina tradicional esta es utilizada en forma de infusión y decocción para tratar malestares estomacales, resfriados, catarros y neumonía. En este trabajo se seleccionó, fraccionó de forma manual, secó y pulverizó el material vegetal (hojas y flores). Posteriormente se sometió a extracción usando como disolvente agua, proceso que se realizó por medio de decocción (D10M) e infusión (I10M) durante 10 min, se determinaron los fenoles y flavonoides totales y se evaluaron las actividades antioxidante y antimicrobiana. La D10M mostró la mayor cantidad de fenoles y flavonoides totales (609,9 mg EAG/ 100 g de E.S y 395, 9 mg EQ/ 100 g E.S respectivamente). D10M también presentó la EC_{50} más baja ($29,7 \pm 4,1 \mu g/mL$) en cuanto a mayor actividad captadora sobre el radical DPPH y fue el único que mostró inhibición sobre *Staphylococcus aureus* en pruebas de difusión por agar y conteo celular por medio de la cámara de Neubauer, actuando como agente bacteriostático, mientras que I10M sólo afectó la morfología de la bacteria.

Este trabajo demuestra la presencia de fenoles y flavonoides totales, así como la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos acuosos de *Tagetes minuta* L., especie que crece en el desierto de Atacama, Antofagasta, Chile. De esta forma se contribuye a la validación del uso popular de esta especie.

Agradecimientos: Proyecto UCN3315-2010

Correo electrónico: gabinocl@yahoo.com

P067. EVALUACION DEL EFECTO HIPOGLICEMIANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE *BAUHINIA FORFICATA* SUBSP. *PRUINOSA* EN PACIENTES CON PREDIABETES Y DIABETES MELLITUS TIPO 2 (Evaluation of Hypoglycemic effect of *Bauhinia forficata* Link subsp. *pruinosa* aqueous extract in prediabetic and type 2 diabetic patients).

Tolosa, P.A.¹, Avello M.A.², Morales F.E.³, Pastene E.R.⁴, Peña C.G.⁵

¹ Departamento de Farmacia, Universidad de Concepción, Chile. ² Farmacognosia, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Chile. ³ Farmacia Clínica, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Chile. ⁴ Lab. de Farmacognosia, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Chile. ⁵ Lab. de Electroquímica, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Chile.

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una alteración metabólica caracterizada por hiperglicemia crónica, y un importante factor de riesgo cardiovascular con una elevada morbimortalidad en Chile. El control metabólico de la DM2 alcanza aproximadamente un 36%, evidenciando la necesidad de intervención. La Fitoterapia puede ser un complemento útil en estas situaciones, razón por la que se evaluó el efecto de *Bauhinia forficata* Link subsp. *pruinosa* o "Pata de Vaca" en el tratamiento complementario de pacientes prediabéticos (preDM) y DM2, según su uso en medicina tradicional. Se elaboraron dos infusos (0.15% y 1%) más un extracto liofilizado y se estandarizaron en base a los marcadores fitoquímicos rutina (R) y trigonelina (T) mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplado a detector electroquímico y UV respectivamente. Luego, se realizó un estudio clínico cuasi experimental a un grupo de voluntarios con preDM y DM2, quienes tomaron diariamente del infuso 0.15% una dosis (250 cc) tres veces al día post comidas durante 3 meses. Se determinó quincenalmente la glicemia en ayunas, presión arterial y peso, además del %HbA1c al inicio y final del estudio. Se determinó en el infuso 0.15% el contenido de rutina (2.80 ± 0.22 µgR/ml infuso) y trigonelina (2.87 ± 0.07 µgT/ml infuso), lo que por dosis equivale a 0.70 ± 0.05 mg de rutina y 0.72 ± 0.02 mg de trigonelina. Se obtuvo una reducción estadísticamente significativa del %HbA1c de 0.57 ± 0.82 ($t=2.680$; $p=0.018$). No se apreciaron diferencias significativas en el peso ni el perfil glicémico de los pacientes, mediante la prueba ANOVA ($\alpha=0.05$). El análisis estadístico se realizó mediante el software SPSS 17.0. Finalmente, se determinó que el uso dado por la medicina tradicional a las hojas de pata de vaca podría apoyarse en evidencia científica, siendo un complemento útil en preDM y DM2, por lo que son necesarios mayores estudios.

Agradecimientos: Proyecto FONIS SA12I2257 y Beca CONICYT 22101346.

Correo electrónico autor: pametolosa@udec.cl

Socio Patrocinante: Avello, M.A.

P068. EFECTO DEL PROPÓLEOS CHILENO SOBRE EL CRECIMIENTO, ADHERENCIA Y FORMACIÓN DE BIOFILM DE LA BACTERIA CARIOGÉNICA *Streptococcus mutans* (Effects of Chilean propolis on grow, adherence and biofilm formation of the cariogenic bacteria *Streptococcus mutans*).

Jorge Veloz^{1,3} Leticia Barrientos^{1,3}, Marysol Alvear^{2,3}, Magdalena Esparza³, Luis A. Salazar^{1,3}.

¹Centro de Biología Molecular y Farmacogenética, ²Laboratorio de Bioquímica de Suelos, ³Núcleo Científico Tecnológico en Biorecursos, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

Streptococcus mutans constituye el principal agente etiológico en el desarrollo de caries dental, formando la placa microbiana en la superficie del diente, por lo que su control constituye un interesante blanco terapéutico. Polifenoles de diversas fuentes han demostrado tener diversas actividades biológicas, incluyendo capacidad antimicrobiana. Así, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de un extracto etanólico de propóleos chileno y polifenoles comerciales sobre el crecimiento, la adhesión celular y la formación de biofilm de *Streptococcus mutans*. El extracto de propóleos fue caracterizado mediante HPLC. Fue determinada la concentración bactericida mínima por el método de dilución en microplaca. La adherencia celular fue cuantificada mediante tinción de cristal violeta 1%. La estructura del biofilm fue visualizada mediante microscopía confocal. Entre los componentes del extracto se encontraron flavonoides como pinocembrina, apigenina, galangina, quercetina y ácido cafeico fenil éster. La concentración bactericida mínima fue de $1,04$ µg mL⁻¹ para el tratamiento con extracto de propóleos. Mientras que entre los compuestos aislados apigenina fue el de mayor efecto antimicrobiano. El tratamiento con extracto de propóleos logró reducir significativamente la adhesión celular. Además, fue observada una reducción en el grosor del biofilm formado tanto en cultivos tratados con extracto de propóleos como tratados con quercetina y ácido cafeico fenil éster. En conclusión, el tratamiento con extracto de propóleos modifica importantes características involucradas en la formación de placa bacteriana por *Streptococcus mutans*.

P069. EFECTO DEL EXTRACTO CRUDO DE *THUJA OCCIDENTALIS* SOBRE LA QUIMIORESISTENCIA EN LÍNEAS CELULARES DE GLIOMA Y GLIOBLASTOMA MULTIFORME.

Angelo Torres A., Yosselyn Vargas V., José Rocha P., Alessandra Dellarossa, Claudia Quezada.

Laboratorio de Patología Molecular, Instituto de Bioquímica y Microbiología, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Introducción. El extracto de *Thuja occidentalis* es utilizado en homeopatía para el tratamiento de neoplasias malignas resistentes a fármacos convencionales desconociéndose del todo su mecanismo de acción. Nosotros hemos reportado que la expresión de proteínas de la familia de transportadores ABC confiere el fenotipo de resistencia múltiple a drogas (MDR) a tumores de mal pronóstico como glioblastomas (GBM). En base a esto, nosotros nos propusimos estudiar el efecto anti-neoplásico de *Thuja* en líneas celulares de GBM (U87) y glioma de rata (C6). **Metodología:** En todos los ensayos se utilizaron ambos tipos celulares y una línea celular estable de glia fetal humana (SVPG12) como control no tumoral. Nosotros evaluamos viabilidad celular (MTT), proliferación (Timidina H^3), apoptosis y expresión de proteínas de la familia de transportadores ABC (MRP1/ABCG2/MRP3) mediante ensayos de *western blot*, bajo los tratamientos de 1:10, 1:100, 1:1.000 y 1:10.000 de diluciones de *Thuja* por 24hrs. **Resultados:** El rango de dilución del extracto con el cual tuvimos más efectos fue entre 1:10 y 1:100. En ambas líneas celulares probadas, U87 y C6 respectivamente, se observó una marcada disminución en la viabilidad celular (87%/68%) y proliferación celular (67%/90%). Además obtuvimos un significativo efecto pro-apoptótico (65%/50%) sin afectar a la línea SVPG12. A la vez logramos una disminución significativa en la expresión de ABCG2 (70%/50%) y MRP-3 (20%/24%), sin apreciar diferencias en MRP-1. **Conclusión:** El extracto de *Thuja* mostró un efecto anti-neoplásico en las células de GBM humano y glioma de rata de manera similar, sin afectar a la células control. Sugerimos el uso de este extracto como putativo quimiosensibilizador en tumores cerebrales.

Agradecimientos: Financiado por el Proyecto Fondecyt 1121121.

P070. EFECTO ANTIDIABÉTICO DE *BERBERIS BUXIFOLIA* EN UN MODELO CELULAR RESISTENTE A LA INSULINA (Antidiabetic effect of *Berberis buxifolia* in a cellular model of insulin resistant).

Furriánca, M.C.^{1,2}, Alvear M.², Fajardo V.¹, Barrientos L.² y Salazar L.A.².

¹Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Magallanes, Av. Bulnes 01855, Punta Arenas, Chile. ²Programa de Doctorado en Ciencias mención Biología Celular y Molecular Aplicada, Universidad de La Frontera, Avenida Francisco Salazar 01145, Temuco, Chile.

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2) es una enfermedad crónica, metabólica progresiva que en la actualidad afecta a más del 6% de la población mundial. Un evento que caracteriza la etapa inicial de esta patología, es la resistencia a la insulina, que se manifiesta por la falta de respuesta normal a la acción insulínica de tejidos diana (músculo, hígado y tejido adiposo). Dado, la alta tasa de prevalencia anual de la DMT2, surge la necesidad de encontrar terapias alternativas de bajo costo para el tratamiento de esta condición. Por lo tanto, el objetivo de nuestro trabajo, es determinar el consumo de glucosa en células HepG2 resistentes a la insulina, estimuladas por un extracto etanólico de *Berberis buxifolia*. La obtención de células HepG2 resistentes a la insulina, fue realizado siguiendo el protocolo, descrito previamente por Xie *et al.*, 2006 y Lu *et al.*, 2011. Luego mediante un ensayo colorimétrico enzimático de glucosa oxidasa se determinó la tasa de consumo de glucosa en el sobrenadante de las células HepG2 estimuladas por el extracto de la raíz de *Berberis buxifolia* a las 24 horas. Nuestros resultados, muestran que el extracto en estudio, aumentaría significativamente la captación de glucosa en células resistentes a la insulina, con respecto al control. Lo cual podría deberse a los compuestos activos descritos para esta especie, tal como la berberina. Por otro lado, es escasa la información para *Berberis buxifolia* como agente antidiabetogénico. De aquí, surge la relevancia de nuestros resultados, ya que permitiría fundamentar el uso de esta planta como terapia alternativa para el tratamiento de la diabetes.

Agradecimientos: A Conicyt por Beca de Apoyo a Tesis Doctoral (N° 24121475) y a la Beca para Estudio de Doctorado en Chile.

Correo electrónico: maria.furrianc@umag.cl

P071. ACTIVIDAD ANTIFUNGICA FRENTE A NOSEMA CERANAE DEL ACEITE ESENCIAL OBTENIDO DE DOS ESPECIES VEGETALES NATIVAS CHILENAS CRYPTOCARIA ALBA Y MAYTENUS BOARIA (Antifungal activity against *Nosema ceranae* essential oil obtained from two Chilean native plant *Cryptocaria alba* and *Maytenus boaria*)

Bravo, J.¹, Carbonell, V.¹, Benavides, A.¹, Camilo, P.¹, Delporte, C.¹

¹Laboratorio de Productos Naturales, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santos Dumontt 964, Santiago, Chile.

Dentro de los agentes patógenos de *Apis mellifera* se encuentra *Nosema apis* y *Nosema ceranae*, este último se ha asociado al despoblamiento de colmena. En este estudio el objetivo fue evaluar la actividad antifúngica de los aceites esenciales proveniente de dos especies vegetales nativas Chilenas *Cryptocaria alba* y *Maytenus boaria* frente *Nosema* spp.

La obtención de los aceites esenciales fue realizada mediante la técnica de destilación por arrastre de vapor mediante un equipo Clevenger. Se evaluó la toxicidad de diferentes concentraciones de las esencias frente a *Apis mellifera*. Con estos resultados se determinaron las concentraciones inocuas para evaluar actividad antifúngica de los aceites esenciales frente a abejas infectadas con *Nosema ceranae*. Los resultados obtenidos de este ensayo demostraron una significativa actividad antifúngica dosis dependiente de los aceites estudiados, como fármaco de referencia se utilizó la fumagilina. Se determinó mediante CG-MS los componentes mayoritarios del aceite esencial seleccionado por presentar mayor actividad antifúngica frente a *Nosema ceranae* y rendimiento al momento de la extracción, encontrando tres monoterpenos mayoritarios. En una etapa posterior de este estudio se evaluará la actividad de estos compuestos frente a *Nosema ceranae*.

Agradecimientos: Beca CONICYT 24121561, MECESUP, Consorcio Apícola.

P072. DETERMINACIÓN DE EFECTO GASTROPROTECTOR DE EXTRACTOS DE QUINTRAL DE ÁLAMO (*Tristerix corymbosus*) (Determination of gastroprotective effect of Quintral de Álamo (*Tristerix corymbosus*) extracts)

Arias, F.^{1,2}, Pastene, E.¹ y Schulz, B.²

¹Laboratorio de Farmacognosia, Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia. ²Laboratorio de Toxicología, Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia

El quintral (*Tristerix corymbosus*), es una planta nativa hemiparásita principalmente del álamo, del cual deriva su denominación común: quintral de álamo, es una planta utilizada empíricamente por la medicina tradicional mapuche como antiulceroso, antiinflamatorio e hipocolesterolemizante. No existen estudios químicos o farmacológicos que apoyen estas aplicaciones terapéuticas. Nuestro trabajo consistió en una caracterización químico-farmacológica de un extracto hidroalcohólico de esta planta (rendimiento = 20,56 ± 0,24% dw). El fraccionamiento de este extracto en un sistema trifásico compuesto por agua, acetonitrilo, terbutilmetileter y n-hexano (2:3:2:2 v/v/v/v) permitió agrupar los compuestos del extracto según su polaridad y confirmar la presencia de compuestos derivados de núcleo esteroideo, tanino (principalmente en la fracción más hidrófoba), flavonoides, y otros compuestos fenólicos (en el extracto más hidrofílico). Para caracterizar de mejor manera las fracciones más polares, se analizó su perfil mediante TLC y HPLC-ESI-MS/MS, identificándose compuestos derivados de ácido gálico, quercetina, kaempferol, catequina y procianidinas poliméricas. Además, de esta fracción se aislaron los componentes mayoritarios por estrategias cromatográficas como MCI-gel con una gradiente de fase móvil agua/acetonitrilo, obteniéndose 7 fracciones diferentes, las que se utilizaron para verificar el potencial gastroprotector de la planta mediante un estudio *in vitro* de su efecto sobre *Helicobacter pylori* y su enzima ureasa, uno de los principales factores de virulencia. Varias fracciones fueron capaces de inhibir la actividad enzimática en concentraciones de 400 µg/mL, destacándose una de ellas con inhibición del 90%. Dicha fracción se purifica nuevamente con una variación de la gradiente de fase móvil obteniéndose fracciones más refinadas, observándose inhibición de la enzima con concentraciones del rango de 400 a 50 µg/mL, con una IC50 de 147,5 µg/mL.

Agradecimientos: Financiado por Proyectos Fondecyt 11110442 y 1120290

Correo electrónico: franarias@udec.cl

Socios Patrocinantes: Pastene, E. ; Schulz, B.

P073. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD Y ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA TÓPICA *IN VIVO* DE PROPÓLEOS DE LA REGIÓN METROPOLITANA (Quality determination and *in vivo* topical antiinflammatory activity of propolis from metropolitan region).

Figueroa, C.¹, Valenzuela-Barra G.¹, Castro C.¹, Salinas R.¹, Chávez C.¹, Silva X.², Delporte C.¹

¹Laboratorio de Productos Naturales. Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

²Unidad de pruebas Biológicas, Instituto de Salud Pública (ISP).

El propóleo es una sustancia de naturaleza compleja y ampliamente utilizada por la medicina folclórica. Está constituido por sustancias resinosas, gomosas y balsámicas; ceras, aceites esenciales y polen, entre otras. La obtención de éste se lleva a cabo cuando las abejas extraen sustancias de distintas especies vegetales, para mezclarlas posteriormente con secreciones de sus glándulas mandibulares. En Chile se han realizado escasas evaluaciones de calidad y de los efectos farmacológicos que avalen sus propiedades terapéuticas, a diferencia de lo que ocurre en otros países.

El objetivo de este trabajo consistió en evaluar y comparar la calidad de cinco propóleos de la Región Metropolitana de Santiago de Chile (Caleu, Cajón del Maipo, Curacaví, Buin y Pirque) utilizando la Norma Argentina IRAM-INTA 15935-1. Además, determinar por primera vez en propóleos nacionales el efecto antiinflamatorio tópico (EAI) utilizando el modelo de inducción de edema en oreja de ratón. Como agentes inflamatorios se emplearon ácido araquidónico (AA) y 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol (TPA). El sacrificio de los animales se efectuó transcurrido 1 h para el AA y 6 h para el TPA. Según los resultados obtenidos los propóleos chilenos evaluados, cumplieron con los parámetros exigidos por la norma Argentina. En relación a la actividad antiinflamatoria *in vivo* todos los extractos etanólicos globales de los propóleos estudiados presentaron EAI significativo al utilizar TPA como agente inflamatorio, en el cual destacó el propóleo de Curacaví (62,6 % ± 3,7), sin embargo ninguno superó el efecto alcanzado por el fármaco de referencia indometacina (92,9 % ± 3,2). En la inflamación causada por AA, cuatro de los cinco propóleos mostraron actividad antiinflamatoria significativa, donde los mejores resultados fueron alcanzado por el propóleo de Buin (58,7 % ± 6,5) y Curacaví (57,8 % ± 3,9); ambos mostraron un efecto superior al fármaco de referencia nimesulida (48,8 % ± 4,0).

Agradecimientos: Conicyt por la Beca de apoyo de tesis AT-24121472 y al ISP por los animales de experimentación.

Correo electrónico: cfigueroab@gmail.com

P074. DETERMINACIÓN DE EFECTO ANTIOXIDANTE Y ANTIINFLAMATORIO DE EXTRACTOS DE QUINTRAL DE ÁLAMO (*Tristerix corymbosus*) (Determination of antioxidant and antiinflammatory effects of Quintral de Álamo (*Tristerix corymbosus*) extracts).

Schulz, B.², Arias F.^{1,2}, Pastene E.¹ y Navarro K.³

¹Laboratorio de Farmacognosia, Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia. ²Laboratorio de Toxicología, Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia. ³Laboratorio de Microbiología, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas.

La medicina tradicional mapuche comprende el uso de una gran cantidad de plantas silvestres recolectadas, siendo sus aplicaciones terapéuticas sustentadas solamente de manera empírica. Una de estas plantas con pocos estudios acerca de su efectividad es el quintral (*Tristerix corymbosus*), una planta nativa hemiparásita principalmente del álamo, del cual deriva su denominación común, quintral de álamo. Tradicionalmente el quintral se usa como antiinflamatorio, antiulceroso e hipocolesterolemizante, sin embargo no existen estudios que validen estos efectos ni de los compuestos responsables de ellos. En el presente trabajo se realizó una caracterización químico-farmacológica de un extracto hidroalcohólico de esta planta (rendimiento = 20,56 ± 0,24% dw). El fraccionamiento de este extracto en un sistema trifásico compuesto por agua, acetonitrilo, terbutilmetileter y n-hexano (2:3:2:2 v/v/v/v) permitió agrupar los compuestos del extracto según su polaridad. Para una mejor caracterización del extracto hidroalcohólico y la fracción más hidrofílica se determinó su contenido de polifenoles totales, por el método de folin-ciocalteau, y su capacidad antioxidante mediante la actividad atrapadora del radical DPPH, obteniéndose con el primer ensayo un contenido de polifenoles totales de 19±5% y 29±5%, respectivamente y valores de TEAC_{DPPH} de 604±69 y 644±70 µmol Trolox/g extracto, respectivamente. Adicionalmente, se determinó el efecto citotóxico del extracto hidroalcohólico sobre células AGS, obteniéndose células viables en todo el rango de concentraciones utilizados (500 a 50 µg/mL). Finalmente, se estudió el potencial de extracto en la prevención del síndrome metabólico e inflamación de bajo grado, mediante el ensayo de *Pull Down* sobre esferas agarosa-polimixina, determinándose la capacidad para desplazar la unión de LPS-FITC de origen bacteriano. La fracción rica en procianidinas poliméricas fue capaz de competir con el LPS-FITC en forma concentración-dependiente.

Agradecimientos: Proyectos Fondecyt 11110442 y 1120290

Correo electrónico: bschulz@udec.cl

P075. INFLUENCIA DEL GRADO DE POLIMERIZACIÓN DE PROCIANIDINAS TIPO-B AISLADAS DE MANZANA (*MALUS DOMESTICA*) SOBRE LA ACTIVIDAD UREÁSICA DE *HELICOBACTER PYLORI* (Influence of the degree of polymerization of B-type procyanidins isolated from apple peel (*Malus domestica*) on the urease activity of *Helicobacter pylori*).

Pastene, E.¹; García, A.²; Torres, E.³

¹Laboratorio de Farmacognosia, Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción. ²Laboratorio Patogenicidad Bacteriana, Departamento Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción. ³Laboratorio de Farmacognosia, Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción.

La infección con *Helicobacter pylori* (Hp) posee una prevalencia cercana al 50% en la población mundial. Uno de los principales factores causantes de virulencia es la enzima ureasa, la cual es esencial en las primeras etapas de colonización gástrica ya que neutraliza la acidez del estómago, lo que permite su supervivencia. Se ha encontrado que ciertos compuestos polifenólicos presentes en la cáscara de manzana (*Malus domestica*) podrían mejorar afecciones gastrointestinales crónicas inducidas por *H. pylori*. Dentro de estos polifenoles, se identificó a las procianidinas como inhibidores de la ureasa. Sin embargo, hasta ahora no se había evaluado las relaciones de estructura-actividad asociados a estos compuestos. En este trabajo, se evaluó el efecto de las procianidinas tipo B obtenidas de cáscara de manzana con diferente grado de polimerización, sobre la actividad ureasa de *Hp*. Mediante diferentes técnicas cromatográficas preparativas se aisló diferentes grupos (Clusters) de procianidinas con grados crecientes de polimerización desde los monómeros a tetrámeros (Dpm = 1-4). Se encontró que la actividad inhibitoria de las fracciones de procianidinas de la cáscara de manzana contra la ureasa comercial (Jack bean) es dependiente del peso molecular, y de la concentración de procianidinas, por lo que a mayor grado de polimerización de las fracciones de procianidinas existió un aumento en el porcentaje de inhibición contra la ureasa, así también, a mayor concentración de procianidinas se encontró mayor actividad anti-ureasa. Para la ureasa de *Helicobacter pylori* se logró encontrar inhibición de la ureasa, solo en las fracciones de mayor peso molecular de procianidinas.

Agradecimientos: Proyecto FONDECYT 11110442

Correo electrónico: edgar.pastene@gmail.com

P076. ESTUDIOS *IN VITRO* DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE *BUDDLEJA GLOBOSA* HOPE Y *PLANTAGO MAJOR* L (In vitro studies of the antioxidant effect of *Buddleja globosa* Hope and *Plantago major* L extracts).

Müller-Sepúlveda, A.J.¹; Saavedra I.² y Letelier M.E.¹

1 Laboratorio de Química Farmacológica y Toxicológica, Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. 2 Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM & Centro de Investigaciones Farmacológicas y Toxicológicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Los productos medicinales elaborados sobre la base de extractos naturales deben ser caracterizados en sus diferentes etapas de elaboración y en su presentación final. La caracterización se hace en sus cualidades botánicas y medicinales para cumplir con los requisitos exigidos por las Agencias de Medicamentos. Cumpliendo con esta norma internacional, a través de diferentes metodologías, caracterizamos la capacidad antioxidante *in vitro* de dos plantas medicinales ampliamente utilizadas en Chile: *Buddleja globosa* Hope, conocido como "Matico" y *Plantago major* L, conocido como "Llantén". Matico es un arbusto autóctono cuyas hojas perennes se utilizan para curar heridas y úlceras; además posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, cicatrizantes, analgésicas. Por otra parte, Llantén es una planta herbácea perenne, con una amplia distribución mundial, cuyas hojas se utilizan para facilitar la cicatrización y prevenir la infección de heridas, además posee características hepato-protectoras, analgésicas, anti-inflamatorias y antipiréticas.

Extractos hidro-alcohólicos de hojas de matico y llantén (previamente estandarizados en su cultivo, cosecha y elaboración) fueron caracterizados por separado y en conjunto en su capacidad antioxidante *in vitro*, de acuerdo a la inhibición de la lipoperoxidación microsómica y la protección de tioles microsómicos. Los resultados individuales demuestran que el extracto de matico posee una mayor capacidad antioxidante que el extracto de llantén, tanto para la inhibición de la lipoperoxidación microsómica (EC₅₀ matico=0,078uL v/s EC₅₀ llantén= 0,25uL) como para la protección de la oxidación de tioles (EC₅₀ matico=0,086uL v/s EC₅₀ llantén= 0,28uL), ambos fenómenos inducidos por el sistema pro-oxidante Cu²⁺/ascorbato. En cambio cuando se utilizan ambos extractos en mezcla, se observa un efecto aditivo para la inhibición de la lipoperoxidación y un efecto sinérgico para la protección de la oxidación de los tioles microsómicos. Podemos concluir que ambos extractos son excelentes antioxidantes *in vitro*, y cuando se utilizan en conjunto poseen un efecto sinérgico.

Agradecimientos: Beca Apoyo Tesis Doctoral CONICYT 24121481. Laboratorio Ximena Polanco.

Correo electrónico: andrea.muller.s@gmail.com

P077. PROTECCIÓN DEL MIOCARDIO CONTRA EL DAÑO POR REPERFUSIÓN EN LA ANGIOPLASTIA CORONARIA PERCUTÁNEA: PAPEL DE LA VITAMINA C EN DOSIS MASIVAS.

Rodrigo, R.¹, Prieto J.C.^{1,2}, Dussaillant G.³, Ramos C.⁴, Leon L.⁵, Gárate J.⁶, Hasson D.¹, Libuy M.¹, Feliu F.¹, Gormaz J.G.¹

¹Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

²Departamento Cardiovascular, Hospital Clínico Universidad de Chile. ³Unidad de Hemodinamia, Departamento Cardiovascular, Hospital Clínico Universidad de Chile. ⁴Departamento de Radiología, Hospital Clínico Universidad de Chile. ⁵Unidad de Hemodinamia, Centro Cardiovascular, Hospital Clínico San Borja Arriarán. ⁶Unidad Coronaria, Centro Cardiovascular, Hospital Clínico San Borja Arriarán

La angioplastia coronaria percutánea es ampliamente utilizada en pacientes que han tenido un infarto agudo de miocardio (IAM). Si bien este procedimiento ha mejorado significativamente el pronóstico de estos pacientes, paradójicamente contribuye a exacerbar el daño inicial. Este daño se asocia a la generación de estrés oxidativo resultante del fenómeno isquemia-reperfusión. El daño por reperfusión puede dar cuenta hasta de un 50% del tamaño final del infarto de miocardio. No existe terapia profiláctica efectiva para la reperfusión letal. El objetivo del presente proyecto fue reducir el tamaño del infarto mediante la aplicación de una infusión de dosis masivas de vitamina C en pacientes con IAM sometidos a angioplastia coronaria percutánea. Se diseñó un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, que se está aplicando en pacientes que ingresan al Hospital Clínico de la Universidad de Chile y al Hospital Clínico San Borja Arriarán que cumplen los criterios de inclusión y exclusión y firman el consentimiento informado. Se administra una dosis oral de vitamina E (800 UI), seguida de una infusión de ascorbato de sodio (320 mmol/L). Se extraen muestras seriadas de sangre para determinar biomarcadores relacionados con daño miocárdico, estrés oxidativo e inflamación. El grupo control recibe placebo e infusión de solución de cloruro de sodio de igual osmolaridad que la infusión de vitamina C. Se practica un examen de resonancia magnética cardíaca 6 y 84 días después, para determinar el tamaño del infarto y las características funcionales del corazón. Hasta ahora no se han observado eventos adversos. El plasma de los pacientes con niveles de ascorbato sobre 10 mmol/L (bloquea la reacción entre óxido nítrico y radical anión superóxido) mostraron elevada capacidad antioxidante y reducidos niveles de lipoperoxidación. Las características morfológicas y funcionales del corazón requieren de un número mayor de pacientes reclutados para obtener datos estadísticamente significativos.

Agradecimientos: FONDECYT 1120594

P078. DETERMINANTES GENÉTICAS DE DEPRESIÓN EN PACIENTES DE ATENCIÓN PRIMARIA EN CHILE (Genetics determinants of depression in a primary care patients sample in Chile).

Rojas, R.A.^{1,2}, Aedo G.^{1,2}, Saldívar S.², Hormazabal N.², Carroza A.² y Vicente B.²

¹Laboratorio de Biofármacos Recombinantes. Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción. Chile. ²Laboratorio de Psiquiatría Genética y Molecular. Departamento de Psiquiatría y Salud Mental, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción. Chile.

Con el objetivo de identificar factores de riesgo y de protección genéticos y psicosociales para la aparición y la evolución de los episodios depresivos se estudió una muestra aleatoria de pacientes atendidos en los centros de atención primaria de salud en la provincia de Concepción.

Metodología: Se realizó un seguimiento de 6 y 12 meses a una muestra aleatoria inicial de 2.480 pacientes que acuden a centros de atención primaria. Se recogió información sobre la presencia/ausencia de la depresión y una serie de potenciales factores de riesgo y de protección. En una muestra de saliva se analizaron dos variantes genéticas: 5HTTLPR y uMAO en el transportador de serotonina y de la monoaminooxidasa, respectivamente. Genes que son importantes blancos farmacológicos para el tratamiento de la patología

Resultados: Los resultados preliminares muestran una asociación del genotipo s/s del 5HTTLPR con un aumento del riesgo de depresión, similar a lo descrito en población española. Sin embargo, el polimorfismo uMAO no es un factor de riesgo asociado con los trastornos depresivos.

Conclusión: En la muestra estudiada en la provincial de Concepción existe una asociación entre el genotipo s/s del 5HTTLPR y un mayor riesgo de depresión, que es independiente de la edad y el sexo, pero no hay asociación con la alta actividad de la variante uMAO. Sin embargo estos hallazgos resultan asuspiciosos en el área de la epidemiología genética confirmando la utilidad del 5HTTLPR como marcador genético de riesgo para la patología depresiva. Estudios a continuación se proyectan a evaluar su utilidad como marcador farmacogenético de la respuesta al tratamiento del trastorno depresivo.

Agradecimientos: Proyecto Fondecyt 1110687

Correo electrónico: romrojas@udec.cl

P079. DETERMINACION DE LOS PARAMETROS FARMACOCINETICOS DE UN REGIMEN DE DOSIFICACION AMPLIADO DE METRONIDAZOL PARA EL MANEJO DE INFECCIONES ANAEROBICAS (Pharmacokinetic parameter of oral metronidazole extended dosage for treatment anaerobic infections).

Morales, F.E.,¹ von Plessing, G.C.,² Fernández, B.P.,¹ Mella, S.³

¹Farmacia Clínica, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción Chile. ²Laboratorio de Biofarmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Chile. ³Hospital regional Guillermo Grant Benavente, Concepción Chile

Las infecciones anaeróbicas constituyen una causa común de enfermedades potencialmente severas y con una elevada mortalidad. Frecuentemente son causadas por bacterias anaeróbicas del género *Peptotryptococcus spp.* y *Bacteroides spp.* Por su parte, el metronidazol es considerado el antibiótico de elección para el manejo de estos cuadros, sin embargo su administración requiere de dosis múltiples diarias provocando falta de adherencia al tratamiento, aumento en errores de medicación e incidencia de efectos adversos severos entre otras consecuencias. Debido al elevado efecto post antibiótico en conjunto con la rápida actividad bactericida concentración dependiente de MTZ es que la administración de este antibiótico una dosis inferior y en un intervalo ampliado, permitiría alcanzar parámetros PK/PD efectivos. De tal forma, se realizó un ensayo clínico controlado, cruzado, aleatorio simple sobre un grupo de voluntarios adultos sanos quienes recibieron la administración oral de una única dosis de metronidazol de 500mg cada 8 horas (esquema A) ó 1000mg cada 24 horas (esquema B). A cada paciente se le realizó la determinación de los niveles plasmáticos de metronidazol utilizando para ello un método analítico basado en cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y detector DAD previamente validado. Se determinó por la observación de las curvas concentración-tiempo del régimen de dosificación B, los valores medios de C_{max} ($23,3 \pm 6,2$ mg/L), C_{min} ($2,7 \pm 0,5$ mg/L) y t_{max} ($2,7 \pm 0,4$ hrs). Además, se obtuvo el valor de $AUC_{0-24hrs}$ ($246,9 \pm 64$ mg*h/L) por medio del método trapezoidal mientras que se determinó el $AUC_{0-\infty}$ ($274,08 \pm 66,4$ mg*h/L) a través de la extrapolación de las curvas PK al infinito con ayuda del paquete de análisis estadístico PK RStudio (GNU). Finalmente, se determinó que para el manejo de infecciones producidas por *B.fragilis* sensible a MTZ (MIC <2mg/L) el régimen de dosificación de 1000mg cada 24hrs permite alcanzar una relación AUC_{0-24}/MIC (>123) comparable con un régimen de dosificación habitual para el tratamiento de infecciones anaerobias.

Agradecimientos: Proyecto DIUC N° 212.074.049-1.0. Dirección de Investigación de la Universidad de Concepción.

Correo electrónico: felimora@udec.cl

Socio Patrocinante: von Plessing, C.

P080. ASOCIACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS GENETICOS DE CYP2C9 Y LA FARMACOCINÉTICA DE ROSUVASTATINA EN VOLUNTARIOS SANOS (Association between CYP2C9 genetic polymorphisms and Rosuvastatin pharmacokinetics in healthy volunteers).

Mancilla, J.^{1,3}, Sasso J.^{1,2}, Miranda C.¹, Squicciarini V.¹, Saavedra I.², Varela N.^{1,5}, Cáceres D.D.^{1,4}, Quiñones L.¹

¹Laboratorio Carcinogénesis Química y Farmacogenética, IFT. ²Laboratorio de Farmacocinética y Biodisponibilidad, IFT. Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. ³Facultad de Química y Farmacia, Universidad Andrés Bello. ⁴Escuela de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. ⁵Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Las dislipidemias son el principal factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares, produciendo una alta morbi-mortalidad en Chile, constituyendo la primera causa de muerte (28.1%). Las estatinas son el tratamiento de mayor uso en los pacientes dislipidémicos. La rosuvastatina ha demostrado superior eficacia en disminución del colesterol LDL y su metabolismo es principalmente a través de la isoenzima CYP2C9. De acuerdo a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue Determinar la relación entre variantes genéticas de CYP2C9 y los parámetros farmacocinéticos para Rosuvastatina en voluntarios sanos. Se reclutaron 52 voluntarios sanos, separados en 2 grupos para un estudio farmacocinético de 10 mg y de 20 mg de Rosuvastatina, respectivamente. Las concentraciones plasmáticas del principio activo fueron determinadas hasta las 48 horas, mediante UPLC/Masa-Masa. La determinación genotípica en muestras de ADN genómico de los voluntarios se realizó a partir de muestras de sangre o de hisopado bucal mediante PCR-RFLP. Del grupo de estudio de 10 mg de Rosuvastatina, se reclutaron 12 mujeres y 12 hombres con un promedio de edad: $25,58 \pm 4,68$ años, peso: $65,58 \pm 8,97$ (Kg), talla: $1,66 \pm 0,095$ (m), IMC $23,62 \pm 1,80$ ($Kg m^{-2}$) y del grupo de 20 mg, 17 mujeres y 14 hombres, con edad: $26,55 \pm 5,26$ años, peso: $62,66 \pm 9,34$ (Kg), talla $1,64 \pm 0,07$ (m), IMC $23,23 \pm 2,35$ ($Kg m^{-2}$). Los parámetros farmacocinéticos para ambos grupos fueron: C_{max} (ng/mL): $8,46 \pm 4,06$ y $14,27 \pm 7,60$; T_{max} (h): $3,41 \pm 1,07$ y $3,72 \pm 0,86$; Ke (h^{-1}): $0,05 \pm 0,02$ y $0,04 \pm 0,01$; $t_{1/2}$ (h): $16,75 \pm 11,14$ y $22,80 \pm 11,12$; $ABC(0-\infty)$ (ng*h/mL): $82,91 \pm 34,66$ y $153,27 \pm 66,98$, respectivamente. La frecuencia alélica de CYP2C9*2 fue de 0,02 para el primer grupo. No se han encontrado otros alelos en los grupos de estudio. Se observa una disminución de C_{max} ($3,33$ ng/mL) y $ABC_{0-\infty}$ ($41,3$ ng*h/mL) para el alelo CYP2C*2 encontrado en un sólo voluntario. Los resultados aunque preliminares muestran una posible utilidad de las variantes genéticas de CYP2C9 como descriptores de la respuesta terapéutica de Rosuvastatina.

Correo electrónico: jeandry.beau@hotmail.com

Socio Patrocinante: Quiñones, L.

P081. ESTUDIO FARMACOGENÉTICO EN PACIENTES CON CÁNCER TESTICULAR.

Cayún J.¹, Roco A.¹, Peña K.², Berrios M.³, Cerda B.⁴, Godoy B.⁵, Sáez L.⁵, Quiñones L.¹, **Saavedra, I.**¹

¹Centro IFT, Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. ²Hospital San Juan de Dios. ³Hospital Clínico Universidad de Chile. ⁴Instituto del Cáncer. ⁵Universidad Santo Tomás.

El presente trabajo tiene por objetivo estudiar la asociación entre polimorfismos genéticos en enzimas de biotransformación y la toxicidad del esquema cisplatino-etopósido-bleomicina (PEB) en pacientes con cáncer testicular y evaluar la influencia del polimorfismo genético en *GSTM1* sobre la farmacocinética de cisplatino. Se realizó la genotipificación de los polimorfismos *CYP3A4*1B*, *GSTM1* nulo, *GSTT1*nulo y *BLMH (A1450G)* realizadas mediante PCR-RFLP a partir del ADN de 63 pacientes con cáncer testicular. Adicionalmente, a 8 pacientes se les realizó un estudio farmacocinético de cisplatino. Los niveles plasmáticos de cisplatino fueron medidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los resultados muestran que los pacientes con el genotipo *GSTM1* presente experimentan más leucopenia grado 3-4 (OR=0,205; 95% CI 0,0405-1,0459). Linfocitopenia severa fue más frecuente en pacientes con el genotipo *GSTT1* nulo (OR=29, 95% CI 1,29-650,0). Los pacientes con el genotipo *BLMH A/G* experimentaron más toxicidad hematológica grado 3-4 (OR=7,67, 95% CI 2,14-27,35) y leucopenia grado 3-4 (OR=29, 95% CI 1,2938-650,015). El promedio poblacional estimado para el aclaramiento (CL) fue de 9,97 l/hr y el volumen de distribución (V1) fue 6,48 l. Ninguna covariable, incluyendo el polimorfismo *GSTM1* nulo, mejoró la variabilidad intersujeto. En conclusión, los polimorfismos *GSTM1* nulo, *GSTT1* nulo y *BMLH (A1450G)* están relacionados con la toxicidad luego del esquema de quimioterapia en pacientes con cáncer testicular. En el estudio farmacocinético preliminar de cisplatino, ningún parámetro se ve influenciado por el genotipo *GSTM1* nulo.

Agradecimientos: Centro IFT, Lab. Farmacocinética y biodisponibilidad.

P082. ANALISIS DE LOS POLIMORFISMOS DE CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C19*2, CYP1A2*1F Y SU RELACIÓN CON LA FARMACOCINÉTICA DE ACENOCUMAROL EN VOLUNTARIOS SANOS (Analyses of CYP2C9 * 2, CYP2C9 * 3, CYP2C19 * 2, CYP1A2 * 1F polymorphisms and the relationship with Acenocoumarol pharmacokinetics in healthy volunteers).

Lara, R.A.^{1,3}, Cáceres D.D.^{1,4}, Miranda C.¹, Saavedra I.², Lavanderos M.², Sasso J.^{1,2}, Varela N.^{1,5}, Quiñones L.¹

¹Laboratorio Carcinogénesis Química y Farmacogenética, IFT. ²Laboratorio de Farmacocinética y Biodisponibilidad, IFT. Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. ³Facultad de Química, Pontificia Universidad Católica de Chile. ⁴Escuela de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. ⁵Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La mayoría de los pacientes que reciben tratamientos con anticoagulantes orales por un tiempo prolongado presentan variabilidad en la respuesta. Esto está fundamentado mayoritariamente por polimorfismos en los genes que codifican para enzimas de transporte o metabolismo del medicamento, particularmente aquellas que lo biotransforman (ej. Citocromo P450 (CYP)). La presencia de estos polimorfismos determina que existan diferentes fenotipos metabolizadores. Acenocoumarol es un anticoagulante inhibidor de la vitamina K y de mayor consumo en nuestro país. Este es metabolizado principalmente por las enzimas hepáticas CYP2C9, CYP2C19 y CYP1A2. En base a esto, el presente trabajo estudió la asociación entre los polimorfismos CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C19*2, CYP1A2*1F y la farmacocinética de Acenocoumarol voluntarios sanos.

Los participantes reclutados fueron 31 mujeres y 30 hombres con edades entre 18 y 50 años de edad y con un índice de masa corporal (IMC) promedio de 23 Kg/m². Los procedimientos fueron realizados cumpliendo estrictamente las normativas éticas y los procedimientos de buenas prácticas clínicas. La detección de genotipos se realizó mediante PCR-RFLP y los parámetros farmacocinéticos se obtuvieron a partir la cuantificación de la concentración plasmática de Acenocoumarol en el tiempo mediante un método validado para Cromatografía Líquida de Ultra Resolución acoplada a espectrometría de masa-masa (UPLC-MS/MS). Los resultados muestran una frecuencia alélica de 0,20 para CYP2C9*2; 0,1 para CYP2C19*2 y de 0,80 para CYP1A2*1F en el grupo de voluntarios. Se aprecia una relación, aunque no estadísticamente significativa entre la presencia de las variantes CYP2C19*2 y CYP1A2*1F con altos niveles plasmáticos del fármaco. Por el contrario, la presencia de la variante CYP2C9*2 se relaciona con bajos niveles del fármaco. Los parámetros farmacocinéticos T_{máx}, K_{ex}, T_{1/2} y ABC parecen no verse afectados. Un estudio con un mayor número de individuos permitirá apoyar la validez de estas pruebas genéticas como biomarcadores de la eficacia y seguridad terapéutica de Acenocoumarol.

Correo electrónico: rlara@uc.cl

Socio Patrocinante: Quiñones, L.

P083. ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA ENTRE UNA FORMULACIÓN DE ACENOCUMAROL Y EL PRODUCTO INNOVADOR DEL MERCADO FARMACÉUTICO (Bioequivalence study between an acenocumarol formulation and the innovative product of the pharmaceutical market).

Lavanderos, M.¹, Sasso J.¹, Ortiz M.^{1,2}, Saavedra I.¹

¹Laboratorio de Farmacocinética y Biodisponibilidad, Centro IFT. Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. ²Facultad de Medicina & Departamento de Cardiología, Hospital Clínico Prof. J.J. Aguirre. Universidad de Chile.

Antecedentes: La Bioequivalencia es la comparación de la biodisponibilidad (BD) entre un medicamento equivalente al de referencia. Si ambas BD no presentan diferencias estadísticamente significativas, ambos productos son bioequivalentes.

Objetivo: Evaluar mediante un diseño doble enmascarado y semi-replicado (3 períodos, 3 secuencias), la bioequivalencia de Acenocumarol comprimido 4 mg, con respecto a la formulación de referencia, Neo-Sintrom® (Novartis S.A.).

Métodos: El protocolo consistió en administrar 1 comprimido de 4 mg de la formulación Test y 1 comprimido de la formulación de Referencia de manera replicada, a 36 voluntarios sanos, después de un ayuno de 10 horas, en 3 períodos cruzados, separados por un período de lavado de 7 días. Posteriormente se cuantificaron las concentraciones plasmáticas (Cp) de Acenocumarol por medio de un método de LC-MS/MS en las muestras colectadas a las 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 6,0; 8,0; 12,0; 18,0; 24,0 y 34 horas post administración. Con los datos de las Cp se construyeron las curvas de BD y a partir de ellas se determinaron los siguientes parámetros: área bajo la curva (ABC)_{0-t} y $C_{\text{máx}}$, $t_{\text{máx}}$, k_e y $t_{1/2}$.

Resultados: $C_{\text{máx}}$ 217,7 ± 64,1 y 216,1 ± 62,6 ng/mL; $ABC_{0 \rightarrow t}$ 1539,4 ± 453,6 y 1563,8 ± 407,7 ngxh/mL; $ABC_{0 \rightarrow \infty}$ 1667,5 ± 523,7 y 1668,4 ± 443,3 ngxh/mL para la formulación Test y Referencia, respectivamente. Tanto la $C_{\text{máx}}$ como las ABC presentaron un coeficiente de variación intra-sujeto menor al 30%. El Intervalo de Confianza al 90% para Test/Referencia para $C_{\text{máx}}$ fue: 93,82 a 108,03% y para los parámetros $ABC_{0 \rightarrow t}$ y $ABC_{0 \rightarrow \infty}$ fueron: 92,54 a 103,25% y 92,24 a 103,24%, respectivamente.

Conclusión: Los IC90% de la razón T/R para los parámetros $C_{\text{máx}}$, $ABC_{0 \rightarrow t}$, $ABC_{0 \rightarrow \infty}$ se encuentran dentro del rango de 80 a 125%. Se concluye que ambos medicamentos son equivalentes terapéuticos.

Agradecimientos: Laboratorio de Farmacocinética y Biodisponibilidad, Centro IFT.

Correo electrónico: janylav@hotmail.com

Socio Patrocinante: Saavedra, I.

P084. EFECTO TOXICOLOGICO DE NANOPARTICULAS POLIMERICAS DE PLGA CARGADAS CON PENTOXIFILINA EN RATAS (Toxicological effect of polymeric nanoparticles of PLGA loaded with pentoxifylline in rats).

Ibarra, P.S.^{1,2,3,4}, Ramírez P.^{1,2}, Oyarzun M.¹, Retamal, J.^{1,4}, Vilos, C.^{2,4}, Pelissier, T.⁵, Constandil, L.^{2,4}

¹Laboratorio de Neurobiología, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile. ²Centro para el Desarrollo de la Nanociencia y Nanotecnología, Universidad de Santiago de Chile. ³Doctorado en Biotecnología, Universidad Andrés Bello. ⁴Center for Integrative Medicine and Innovative Science, Facultad de Medicina, Universidad Andrés Bello. ⁵Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La nanomedicina es considerada una tecnología que ha revolucionando el área de la nanotecnología, brindando avances en la diagnosis y tratamiento de enfermedades. Los objetos a escala nano, adquieren nuevas propiedades y funciones que difieren de las observadas al homólogo a mayor escala, principalmente por su relación tamaño v/s superficie. Sin embargo, las mismas propiedades que hacen únicas a las nanopartículas también son responsables de su potencial toxicidad. Por lo tanto, realizar estudios toxicológicos de las nuevas nanopartículas sintetizadas es básico para su utilización en el tratamiento y diagnosis en animales y humanos. Nuestro laboratorio ha desarrollado nanopartículas poliméricas de PLGA (ácido poli(láctico-glicólico)) cargada con el fármaco pentoxifilina (nPLGA-PTX), la cual mostró efectividad en la disminución de la hiperalgesia generada en diferentes modelos de dolor crónico en la rata. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la administración intratecal de nPLGA-PTX (10µL de una solución equivalente a 0,3 µg de PTX) sobre el perfil bioquímico, renal y hepático en ratas. Además se evaluó el efecto de las nPLGA-PTX sobre el nivel apoptosis en la médula espinal, cercana al sitio de inyección. Los 3, 7 y 10 días posteriores a la inyección de nPLGA-PTX, se extrajo sangre de los animales mediante decapitación para medir los perfiles bioquímico, renal y hepático. El día 7, los animales fueron perfundidos y un ensayo de túnel fue desarrollado en cortes de la médula espinal.

Nuestros resultados muestran que no se observan cambios significativos en los parámetros evaluados, como tampoco en el nivel de apoptosis en la médula espinal, respecto con ratas controles. Adicionalmente las nPLGA-PTX, tampoco modificó el peso ni el consumo de alimento, en los 10 días estudiados. En conclusión podemos afirmar que las nPLGA-PTX, administradas intratecalmente y en la dosis indicada, no generan efectos tóxicos en la rata.

Agradecimientos: FONDECYT 1120952, CEDENNA FB0807.

Correo electrónico: paula.ibarra@usach.cl

Socio Patrocinante: Pelissier, T.

P085. DISEÑO DE UN DISPOSITIVO PARA LA INFUSIÓN DE FÁRMACOS Y RECOLECCIÓN CONTÍNUA O DISCONTINUA DE LÍQUIDO CÉFALO RAQUÍDEO EN RATAS (Design of a device for drug infusion and continuous or discontinuous collection of rat cerebrospinal fluid).

Valdes, C.¹, Constandil L.¹ y Laurido C.¹

¹Laboratorio de Neurobiología, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile.

El control de la composición del compartimiento cerebro espinal es fundamental cuando se pretende aplicar fármacos a la glía espinal. Muchos dispositivos para la obtención de líquido céfalo raquídeo (LCR) han sido publicados. Sin embargo, ninguno de ellos permite la infusión y recolección continua o discontinua de LCR en un mismo dispositivo. El propósito del diseño de este sistema se basa en la posibilidad de inyectar fármacos de absorción rápida (fármaco en solución) o lenta (encapsulados en nanopartículas) que puedan ser trazados en el tiempo mediante la recolección de pequeñas muestras de LCR. Brevemente, este sistema consiste de un aparato estereotáxico en el cual se posiciona la cabeza de la rata anestesiada, asegurada mediante barras en los conductos auditivos. Luego, la cabeza se posiciona hacia abajo a un ángulo de 45°, para luego introducir una aguja en la cisterna magna mediante un micromanipulador. Esta aguja (25Gx1'') forma parte de una estructura en T, formada en conjunto con otras dos agujas interconectadas. Una de ellas se conecta a una jeringa Hamilton de 100 µL mediante un adaptador Luer. La otra se conecta mediante un tubo de polietileno de 0,58 mm diámetro interno a un sistema colector de muestra que, a modo de trampa de vacío, permite colectar el LCR en un tubo Eppendorf de 200 µL. Esta trampa de vacío se conecta a una jeringa de 60 ml posicionada verticalmente, cuyo émbolo es traccionado por un peso de 400 g que permite formar un vacío que extrae parte del LCR de una manera lenta y suave. En el caso de la realización de infusión de fármacos, se utiliza la jeringa Hamilton. Resultados obtenidos utilizando este dispositivo incluyen la farmacocinética de fluoresceína inyectada vía intravenosa. Se puede concluir que este dispositivo constituye una herramienta de gran utilidad en la realización de estudios que involucran manipular el compartimiento céfalo raquídeo.

Agradecimientos: DICYT 021343LF y FONDECYT 1120952.

Correo electrónico: esquilo@hotmail.com

Socio Patrocinante: Pelissier, T.

P086. DETERMINACIÓN MICROBIOLÓGICA DE TRAZAS DE MINOCICLINA EN LÍQUIDO CÉFALO RAQUÍDEO EN RATAS (Microbiological determination of minocycline traces in rat cerebrospinal fluid).

Sanhueza, L.¹, Wilkens M.¹, Valdés C.², Constandil L.² y **Laurido, C.²**

¹Laboratorio de Microbiología Básica y Aplicada. Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile. ²Laboratorio de Neurobiología. Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile.

Numerosos estudios han confirmado el rol de la glía espinal en el desarrollo y persistencia del dolor crónico. En consecuencia, es posible plantear que la supresión farmacológica de la función glial en la médula espinal puede deprimir los mecanismos espinales del dolor. Diferentes fármacos han mostrado que, además de actuar como antibióticos (minociclina, amoxicilina, neomicina, ceftriaxona), presentan actividad anti-inflamatoria en casos tales como artritis reumatoidea, convirtiéndolos en fármacos útiles en estudios de dolor crónico. Minociclina (MC), antibiótico perteneciente a la familia de las tetraciclinas, se utilizó con el propósito de realizar estudios farmacocinéticos en el líquido céfalo raquídeo (LCR) en ratas Sprague-Dawley. Esta determinación se ve usualmente dificultada por el bajo volumen disponible de muestra y por la presencia de otros elementos en el LCR que deben ser extraídos previo a cualquier determinación, utilizando métodos clásicos como HPLC. Se probaron dos cepas de microorganismos ATCC, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, resultando *Staphylococcus* el más sensible a la MC. Resultados preliminares muestran que es posible obtener determinaciones de MC hasta el nivel de ng/mL. Se puede concluir que el método microbiológico es muy simple y sensible, constituyendo una alternativa económica en comparación con las determinaciones realizadas por el método de HPLC. La ventaja de un método microbiológico para determinar MC, es el uso de pequeñas cantidades de muestra necesaria (10-20 µL) sin necesidad de ninguna preparación previa y la alta sensibilidad del método.

Agradecimientos: DICYT 021343LF, FONDECYT 1120952, Beca de Doctorado Nacional CONICYT - 21100130.

Correo electrónico: claudio.laurido@usach.cl

Socio Patrocinante: Pelissier, T.

P087. EVALUACIÓN PRECLÍNICA Y CLÍNICA DE UN BIOPOLÍMERO COMPUESTO POR GELATINA/QUITOSANO/HYALURONATO EN ÚLCERA CUTÁNEA DE ESPESOR TOTAL (Clinical evaluation of a biopolymer made out of gelatin/chitosan/hyaluronan).

Weinstein-Oppenheimer, C.R.^{1,2}, Albornoz F.^{2,3}, Sánchez E.^{2,3}, Ceriani R.², Reyna M.², Herrera, S.², Brown DI.^{2,4}, Henríquez-Roldán C.F.^{2,5}, Young M.E.^{2,3}, Ramírez F.^{6,7}, Quiroz P.⁶; Acevedo C.A.^{2,3}.

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Farmacia, Universidad de Valparaíso, Av. Gran Bretaña 1093, Playa Ancha, Valparaíso. ²Inbiocriotec S.A., Av. Libertad 269, Viña del Mar. ³Centro de Biotecnología Daniel Alkalay, Universidad Técnica Federico Santa María, Avenida España 1680, Valparaíso. ⁴Laboratorio de Biología de la Reproducción y del Desarrollo, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso, Av. Gran Bretaña 1111, Playa Ancha, Valparaíso. ⁵Departamento de Estadística, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso, Av. Gran Bretaña 1111, Playa Ancha, Valparaíso. ⁶CESFAM, Villa Alemana, Avenida Quinta 032, Villa Alemana. ⁷Facultad de Odontología, Universidad de Valparaíso, Carvallo 211, Playa Ancha, Valparaíso.

La ingeniería de tejidos es una disciplina emergente que implica combinar biopolímeros con células con el fin de regenerar tejidos u órganos. En el campo de la curación de heridas existe una necesidad de contar con productos eficaces que otorguen una solución a condiciones clínicas que requieran cobertura cutánea. Dentro de estas últimas las úlceras crónicas son un tipo de lesión cuyo tratamiento presenta un desafío clínico. Esta investigación se propuso como objetivo desarrollar un producto de ingeniería de tejidos compuesto por materiales bioactivos y células cutáneas autólogas. Para lo anterior se formuló una matriz compuesta de gelatina/quitosano/hyaluronato y se desarrolló un método para incorporar células en su interior. El sistema fue evaluado *in vitro* para determinar la viabilidad del componente celular y la expresión de factores de crecimiento. Además se efectuó evaluación preclínica en animales de experimentación en un modelo de lesiones de espesor total. Finalmente se hizo una prueba de concepto en un paciente con úlcera crónica. La matriz diseñada demostró sustentar la proliferación celular y estimular la secreción de TGFβ3 y otros factores de crecimiento. Las pruebas en animales de experimentación demostraron la seguridad del sistema de implante y la producción de VEGF dentro de la herida. Al aplicar una combinación de biopolímero acelular y celular en forma secuencial en un paciente con úlcera crónica se consiguió reducir la percepción de dolor durante los primeros 15 días y la epitelización completa a las 23 semanas. Se concluye que el sistema de implante desarrollado es una herramienta terapéutica promisorio para el tratamiento de lesiones de espesor total. Estos resultados ameritan proseguir con ensayos controlados para validar el producto desarrollado.

Agradecimiento: Proyectos FONDECYT 1120166 y FONDEF D0711075.

Correo electrónico: caroline.weinstein@uv.cl

P088. RECUPERACIÓN DE PECTINAS CON ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA A PARTIR DE MATERIALES DE DESECHO AGROINDUSTRIAL (Pectins recovery from agroindustrial byproducts with antiproliferative activity).

Weinstein-Oppenheimer, C.R.^{1,2}, Reyna M.¹, Marchant, S.¹, Meneses C.¹, Concha J.¹, Zúñiga M.E.^{2,3}.

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Farmacia, Universidad de Valparaíso, Av. Gran Bretaña 1093, Playa Ancha, Valparaíso. ²Creas-Conicyt Regional-Gore Región de Valparaíso R12C1001, Blanco 1263, of 1402, Valparaíso. ³Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, General Cruz 34, Valparaíso.

Existe una inminente necesidad de incrementar el arsenal terapéutico para el tratamiento de neoplasias, ya que a pesar de la diversidad de moléculas existentes y aprobadas para el tratamiento de estas patologías, las cifras de incidencia y muerte por ciertos cánceres continúan *in crescendo*. Por otra parte, los residuos agroindustriales constituyen un problema ambiental y encontrar un uso farmacológico para moléculas derivadas de los mismos se presenta como una estrategia innovadora para la búsqueda de nuevos medicamentos. Esta investigación se propuso como objetivo recuperar extractos pécticos a partir de una variedad de productos de desecho agroindustrial, tales como coseta agotada de remolacha, raps desgrasado y una serie de frutas, tales como manzana, pera y naranja. Además se evaluó un nutracéutico comercial de pectina cítrica llamado Pectasol. Para lo anterior se sometió a procesos de recuperación química o enzimática los residuos agroindustriales. Los productos recuperados fueron evaluados en su capacidad de reducir la proliferación celular en cultivos celulares de células de cáncer de mama MCF-7 o Caco-2 de cáncer de colon. Todos los productos evaluados exhibieron algún grado de inhibición de la proliferación celular. Se destaca que para pectinas aisladas desde raps, las células MCF-7 exhibieron mayor sensibilidad que las Caco-2 a la inhibición de la proliferación. Los resultados más notables fueron obtenidos con el preparado comercial y con la pectina neutra derivada de pera sobre las células MCF-7 que alcanzaron una inhibición cercana a un 90% de la proliferación celular. Se concluye que existe un potencial interesante en las pectinas como agentes antiproliferativos. Se justifica continuar estudios para profundizar la influencia de la fuente de origen de extracción de las pectinas, así como de los métodos aplicados para su recuperación sobre la actividad biológica detectada.

Agradecimientos: Proyecto FONDECYT 1121062

Correo electrónico: caroline.weinstein@uv.cl

P089. ELABORACIÓN DE MICROPARTÍCULAS POLIMERICAS DE RHN Y EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA CINÉTICA DE LIBERACIÓN DEL SISTEMA (Manufacturing of RHN polymeric microparticles and *in vitro* release kinetics).

Chávez, C.¹; Godoy, R.¹; Gómez Gaete, C.¹

¹Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción.

Las micropartículas poliméricas son biocompatibles, biodegradables y tienen la capacidad de controlar la liberación de distintos principios activos permitiendo su administración como sistemas de depósito, RHN es un fármaco que con actividad antiinflamatoria y antiproliferativa y se presenta como una alternativa para el tratamiento de artritis reumatoide administrado a la forma de inyección intraarticular, sin embargo actualmente no existen formas farmacéuticas de él en el mercado. Objetivo: se elaboraron y caracterizaron micropartículas de RHN, optimizando su proceso de fabricación en base a parámetros de formulación y proceso para finalmente evaluar el comportamiento cinético del sistema mediante un modelo *in vitro*.

Metodología: Se obtuvieron micropartículas mediante la técnica de emulsión evaporación de solvente utilizando una fase orgánica en la que se disolvió el fármaco junto al polímero y una fase acuosa conteniendo un emulgente. Se evaluó el efecto de la variación de la masa inicial de fármaco, el tipo de polímero PLA y PLGA de diferentes viscosidades a fin de optimizar los valores de eficiencia de encapsulación y carga. Sus características se analizaron por microscopía óptica, electrónica y se determinó su potencial Zeta. El estudio de liberación *in vitro* se realizó durante un período de 30 días utilizando como medio receptor un buffer isotónico a pH fisiológico.

Resultados: La formulación optimizada resultó poseer micropartículas esféricas, monodispersas, con un diámetro medio de 4 micrómetros, potencial Zeta de -21,4 mV en agua nanopura, -2,71 mV en NaCl 1mM y una eficiencia de encapsulación cercana al 60%. El estudio de liberación demostró que las micropartículas retardan la salida del fármaco hacia el medio receptor, comportándose como sistema de liberación controlada.

Conclusiones: Se concluye que las micropartículas desarrolladas actúan como sistema reservorio y dadas sus características de composición y tamaño es factible sean inyectadas como forma de depósito intrarticular.

Agradecimientos: Proyecto VRID – Enlace 213.074.050-1.0, Universidad de Concepción

Correo electrónico: catachavez@udec.cl

Socio Patrocinante: Gómez Gaete, C.

P090. GENERACIÓN DE UNA PROTEÍNA QUIMÉRICA COMO PROTOTIPO TERAPÉUTICO PARA EL TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES (Generation of a chimeric protein as a therapeutic prototype for treatment and prevention of cardiovascular diseases).

Jiménez, S.¹; Parra N.¹, González I.¹, Leiva M.¹, Salas-Burgos A.², Toledo J.R.¹,

¹Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, Departamento de Fisiopatología, ²Departamento de Farmacología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte a nivel mundial, con una incidencia del 28%. Estas patologías tienen en común el desarrollo de un proceso aterosclerótico que provoca la disminución del lumen arterial debido a la formación de las placas ateromatosas. Una glicoproteína transmembrana relacionada con este proceso es LOX-1, el receptor para la Lipoproteína de baja densidad oxidada (LDLox). Este se encuentra principalmente en células endoteliales y actúa como receptor scavenger incorporando la LDLox a través de su dominio extracelular, condicionando la formación de la placa. El objetivo del presente trabajo es diseñar, expresar y caracterizar una variante quimérica de la proteína LOX-1 humana basada en su dominio extracelular y precedido por una señal de secreción y acoplado a un fragmento de dimerización. La proteína quimérica se expresó mediante transducción adenoviral en células SiHa, obteniéndose la molécula en el medio de cultivo en su forma homodimérica y glicosilada; lo que fue corroborado mediante western blot y ensayo de deglicosilación. La proteína se purificó y se ensayó su funcionalidad enfrentándola a su ligando natural en ELISA con lo que se comprobó que el diseño realizado mantiene su capacidad funcional de unión al ligando. Esta nueva molécula quimérica podrá evitar la formación de la placa ateromatosa por lo que tendría un importante potencial de uso como prototipo terapéutico para el tratamiento y prevención de enfermedades cardiovasculares.

Agradecimientos: Proyecto VIU 120022

Correo electrónico: silijimenez@udec.cl

Socio Patrocinante: Salas-Burgos, A.

P091. ANTÍGENOS VIRALES CON ESTRUCTURAS SIMILARES A VIRUS (VLP) COMO MODELO PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA (Viral antigens as virus-like particle (VLP), a model for antigenic presentation).

Gutiérrez, F.A.¹; Bravo F.²; Maura-Pérez R.¹; Aylwin C.F.¹; Salas-Burgos A.M.²; Cortez-San Martín M.³; Sánchez O.²; Toledo J.R.¹

¹Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas. ²Departamento Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción. ³Laboratorio de Virología, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile.

El uso de proteínas recombinantes provenientes de patógenos con fines terapéuticos es un campo en desarrollo, que otorga ventajas operacionales y clínicas por sobre las terapias convencionales. Una ventaja en este campo, es la capacidad de las proteínas estructurales provenientes de virus de formar estructuras similares a virus (VLP), sin formar el virión infeccioso. Los VLP exhiben prácticamente los mismos sitios antigénicos que el patógeno completo manteniendo la estructura terciaria y los dominios estructurales. La generación de líneas celulares que puedan expresar establemente proteínas estructurales de ciertos virus, y que estas proteínas puedan formar VLPs, son necesarias como alternativa para combatir a ciertos patógenos. En el presente trabajo se diseñó un constructo génico conteniendo la secuencia de la proteína Cap del circovirus porcino tipo 2 para su inserción en un vector lentiviral, como vehículo de transferencia genética. El vector lentiviral generado expresa bajo un mismo promotor dos proteínas independientes, el antígeno Cap y la proteína reportera GFP separadas por una secuencia IRES. A partir de este vector, se generó una línea celular genéticamente transformada que expresa constitutivamente la proteína Cap en forma de VLP y su selección se realizó basado en la sobreexpresión de GFP y posterior confirmación de la estructura Cap-VLP mediante western-blot. La estructura antigénica del VLP se evaluó enfrentando la línea celular a sueros positivos para circovirus porcino. La disponibilidad de este diseño resulta útil para insertar otros dominios antigénicos en la estructura VLP y potenciar la respuesta inmune contra otros antígenos virales o autoantígenos derivados de células tumorales.

Agradecimientos: Fondef D11I1188.

Correo electrónico: fernagutierrez@udec.cl

Socio Patrocinante: Salas-Burgos, A.

P092. GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ISOFORMA 121 DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR HUMANO (Isoform generation and characterization 121 growth factor human vascular endothelial).

Aedo, G.¹, Mansilla R.², Rojas R.¹, Beltrán C.¹, Salas-Burgos A.¹, Toledo J.², Sánchez O.¹

¹ Laboratorio de Biofármacos. Departamento de Farmacología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción. ² Laboratorio de Biofármacos y Biotecnología. Departamento de Fisiopatología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción.

El factor de crecimiento endotelial vascular es una glicoproteína homodimérica, que funciona como agente mitógeno estimulando la proliferación de las células endoteliales. El VEGF se ha identificado como el factor más importante en el proceso de angiogénesis tumoral o angiogénesis patológica/anormal. La sobre-expresión del VEGF ha sido asociada con la progresión de múltiples tumores sólidos. Así, las terapias anti-VEGF constituyen una alternativa promisoría para el tratamiento de múltiples neoplasias. Con el propósito final de desarrollar nuevas moléculas capaces de bloquear la actividad del VEGF humano, el presente trabajo se enfocó en clonar, expresar, purificar y caracterizar una variante de la molécula VEGF₁₂₁ humana (hVEGF₁₂₁).

En una primera etapa se diseñó una secuencia de hVEGF₁₂₁ conteniendo un tag de 6 residuos de histidina en su extremo C-terminal. El gen diseñado fue obtenido mediante síntesis química y posteriormente clonado en el vector de transferencia adenoviral pAdTrack-CMV. Mediante un proceso de recombinación homóloga en bacterias, el gen de hVEGF₁₂₁ se insertó dentro de un genoma adenoviral contenido en el vector pAdEasy-1 (Agilent Technologies). La transfección de este genoma en células HEK-293 permitió generar un vector adenoviral conteniendo el gen de hVEGF₁₂₁ (Ad-hVEGF₁₂₁). La capacidad de este vector para expresar el hVEGF₁₂₁ se evaluó mediante ensayos de transducción en células SiHa. Se pudo observar que las células transducidas con el vector Ad-hVEGF₁₂₁ secretan altos niveles de hVEGF₁₂₁ al medio de cultivo. La molécula de VEGF recombinante fue purificada mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos. Se demostró que esta molécula se expresa en forma dimérica, al igual que su contraparte nativa. La actividad biológica del hVEGF₁₂₁ se determinó mediante ensayos de proliferación en células HUVEC y ECV-304. La capacidad de hVEGF₁₂₁ para inducir angiogénesis también fue determinada mediante ensayos in vivo en ratones, usando tapones de Matrigel.

Agradecimientos: FONDEF: D10I1282

Correo electrónico: geaedo@udec.cl

Socio Patrocinante: Salas-Burgos, A.

P093. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE UNA VARIANTE RECOMBINANTE DE FSH DE CADENA SIMPLE EN EL COMPLEJO FSH/FSHR (Structural Characterization of a Single Chain Recombinant Variant FSH into the FSH/FSHR Complex).

Teneb, J.C.¹, Cáceres, J.A.¹, Mansilla, R.¹, Bravo, F.¹, Sanchez, O.¹, Salas-Burgos, A.M.¹.

¹Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

La Hormona Folículo Estimulante (FSH) es una molécula fisiológica involucrada en la función reproductiva y la diferenciación sexual, tanto en el hombre como en la mujer. Esta hormona glicoproteica consta de dos cadenas peptídicas unidas no-covalentemente. Actualmente, la FSH es central en la terapia contra la infertilidad. Existen dos tipos de preparaciones de FSH humana, las derivadas de orina y las generadas con tecnología recombinante, siendo estas últimas las más utilizadas. Nuestro equipo de trabajo ha generado una variante recombinante de FSH que contiene ambas cadenas de la FSH humana en una cadena simple (sc-FSH) mediante una secuencia espaciadora. La sc-FSH ha mostrado actividad en ensayos de maduración de folículos bovinos *in vitro*. En este trabajo se busca analizar la interacción de la sc-FSH y su receptor, desde el punto de vista estructural, y también, conocer la dinámica de activación del receptor. Se realizó un modelaje del receptor de FSH (FSHR), utilizando como molde el exodominio de estructura conocida y estructuras homólogas al dominio de 7 segmentos transmembrana buscadas por homología de secuencia en BLAST contra la base de datos del PDB. El receptor fue ensamblado con membrana y simulados por 20ns de dinámica molecular a 300K, 1 atm con el campo de fuerza CHARMM c36 y utilizando NAMD. Paralelamente se construyó un modelo tridimensional de la sc-FSH mediante homología de secuencia con Modeller utilizando las estructuras disponibles de la FSH Humana. Luego se construyó un ensamble con el receptor en complejo con su ligando y fue simulado por 20 ns en condiciones similares. La comparación de la forma apo del receptor, del complejo con la FSH nativa y el complejo con la sc-FSH nos revela detalles claves en el mecanismo de activación y nos permite la optimización de sc-FSH en nuevos diseños.

Agradecimientos: Proyecto CONICYT de Inserción en la Academia N°79112029, INNOVA BIOBIO 13.1279-EM.TES

Correo electrónico: jteneb@udec.cl

Socio Patrocinante: Salas-Burgos, A.

P094. NUEVA PLATAFORMA CELULAR PARA LA PRODUCCION DE HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE HUMANA RECOMBINANTE (New cell platform for the production of recombinant human follicle stimulating hormone)

Meza, C.D.¹, Saavedra P.A.¹, Bravo F.², Zaror S.¹, Salas-Burgos A.M.², Sánchez O.², Toledo, J.R.¹

¹Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas. ²Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción.

La glándula mamaria constituye una alternativa apropiada para producir proteínas recombinantes de interés biofarmacéutico o industrial, pues se demostró que las células epiteliales productoras de leche tienen un alto nivel de secreción y procesamiento de proteínas complejas y glicosiladas como lo es la hormona folículo estimulante (FSH). Esta proteína favorece el desarrollo folicular en mujeres y la espermatogénesis en hombres y se ha relacionado que bajos niveles de FSH están asociados a infertilidad. Por esta razón, es importante contar con un modelo celular *in vitro* a partir de glándula mamaria, que permita evaluar las capacidades de transformación genética de dichas células y la expresión de FSH, en condiciones similares al proceso *in vivo*. La obtención de un modelo celular de glándula mamaria se realizó desde un explante de tejido mamario de una cabra (*Capra hircus*) de 105 días de lactancia. A partir del pase 12 se realizaron ensayos para caracterizar el modelo mediante microscopía confocal y evaluación inmuno-citoquímica y se obtuvo una caracterización positiva para células epiteliales y se corroboró la capacidad de división del cultivo celular hasta 30 pases. Además, el cultivo generado resultó positivo a la capacidad de transformación genética con vectores adenovirales y lentivirales. Se demostró su capacidad de expresión de glicoproteínas recombinantes, usando como modelo la FSH, posterior la transducción adenoviral. Se probó demostró la actividad biológica de esta proteína recombinante por el aumento la foliculogénesis en modelos animales. Finalmente se comprobó que este modelo celular responde a la inducción hormonal aumentando la expresión de proteínas recombinantes. El presente trabajo permite disponer de un modelo celular de glándula mamaria de cabra, mayoritariamente compuesto de células epiteliales, con capacidad de transducción genética, demostrada mediante la expresión y secreción de la FSH recombinante biológicamente activa.

Agradecimientos: VIU 120020

Correo electrónico: catherinemeza@udec.cl

Socio Patrocinante: Salas-Burgos, A.

P095. OPTIMIZACIÓN DE ANTICUERPOS DE CADENA SIMPLE ANTI-VEGF DE ALTA AFINIDAD MEDIANTE MADURACIÓN *IN SILICO* (VEGF-Target High Affinity Single Chain Antibodies Optimization from *in silico* maturation).

Mansilla, R.^{1,2}, Cáceres, J.A.², Bravo, F.², Teneb, J.², Toledo, J.R.¹, Sánchez, O.², Salas-Burgos, A.M.²

¹Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas. ²Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción.

El Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) es una citoquina pro-angiogénica que controla el desarrollo del sistema vascular, y juega un rol crucial en procesos fisiológicos como el desarrollo embrionario y la cicatrización de heridas. No obstante, esta molécula también estimula el desarrollo y progresión de enfermedades inflamatorias y el cáncer, por lo que se ha convertido en un importante blanco terapéutico para el tratamiento de dichas enfermedades. La principal estrategia empleada para inhibir los efectos celulares de esta citoquina implica la utilización de moléculas derivadas de anticuerpos que actúan secuestrando el VEGF y bloqueando la interacción con el receptor VEGFR-2. Basados en esto, en nuestro laboratorio empleamos la tecnología de presentación de proteínas en la superficie de fagos filamentosos (*Phage Display*) con el fin de obtener fragmentos de anticuerpos con capacidad de reconocer específicamente al VEGF, que puedan ser utilizados como herramientas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades como el cáncer. No obstante, los anticuerpos obtenidos mediante esta tecnología no poseen la potencia suficiente para ser utilizados con fines terapéuticos, por lo que nos planteamos como objetivo aumentar la afinidad de dichas moléculas mediante la utilización de metodologías *in silico*. Para cumplir este objetivo en primer lugar caracterizamos energéticamente las interfaz de unión de VEGF con anticuerpos y receptores cristalizados presentes en la base de datos PDB, construimos modelos de las estructuras tridimensional de los fragmentos de anticuerpos capaces de reconocer el VEGF, identificamos aquellos clones capaces de interactuar con el VEGF a través del mismo sitio de unión al receptor VEGFR-2 mediante *docking* proteína-proteína, y finalmente se insertaron mutaciones dentro del parátipo que permitieron aumentar la afinidad por el ligando VEGF.

Agradecimientos: Proyecto Fondef D10i1282

Correo electrónico: romansill@udec.cl

Socio Patrocinante: Salas-Burgos, A.

P096. DESARROLLO Y ESTANDARIZACIÓN DE UN NUEVO PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO HUMANO RECOMBINANTE CON APLICACIONES TERAPÉUTICAS (Development and Standarization of a New Procedure for the Production of Therapeutic Human Epidermal Growth Factor).

Mansilla, R.^{1,3}, Aedo G.³, Maura-Pérez R.¹, Cabezas O.I.², Hugues F.², Salas-Burgos A.³, Sánchez O.³, Toledo J.R.¹

¹Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas; ²Departamento de Ciencias Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias; ³Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción.

El Factor de Crecimiento Epidérmico humano (hEGF) es una citoquina que estimula la migración y proliferación de células epiteliales, endoteliales y fibroblastos. Gracias a este potencial mitogénico, el hEGF se emplea como agente cicatrizante para el tratamiento de heridas agudas y ulcerosas presentes en la piel, el tracto gastrointestinal y renal. Debido a su importancia terapéutica, esta citoquina se produce por vía recombinantes mediante procesos de elevado costo, por lo que se hace necesario desarrollar procesos eficientes para producir hEGF. Considerando estos antecedentes, nos propusimos como objetivo desarrollar un procedimiento de productivo eficiente y racional, basado en la adición de un péptido de 6 residuos de arginina (6xArg) en el extremo C-terminal de hEGF. Logramos alcanzar un nivel de expresión igual a 100 mg/L cultivo, empleando la bacteria *Escherichia coli* para sobreexpresar hEGF en forma de cuerpos de inclusión. Se estandarizó un procedimiento de purificación basado en cromatografía de lecho expandido, intercambio iónico y ultrafiltración, obteniéndose un nivel de expresión igual a 30 mg/L de cultivo, y pureza del 98%. Demostramos que el hEGF producido estimula el crecimiento celular de forma dosis-dependiente, alcanzado un ED₅₀ igual a 10.4 ng/ml, mediante la utilización de un modelo de proliferación en la línea celular de fibroblastos de ratón 3T3. Finalmente comprobamos la capacidad del hEGF para inducir la regeneración de tejido dañado a partir de heridas inducidas en la piel de cerdos. Mediante la utilización de este modelo se comprobó que la aplicación tópica de hEGF sobre el área dañada, genera una disminución significativa en el tiempo de cierre de la herida. A partir de estos datos se concluye que el hEGF obtenido mediante el proceso establecido es biológicamente activo, con capacidad regeneradora de tejido epitelial.

Agradecimientos: Proyecto Innova de apoyo a Tesis 12.492 Proyecto Fondef D10i1282

Correo electrónico: romansilla@udec.cl

Socio Patrocinante: Salas-Burgos, A.

P097. EXPRESIÓN SOSTENIDA DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN GLÁNDULA MAMARIA COMO SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE BIOFÁRMACOS DE NATURALEZA PROTEICA (sustained expression of recombinant proteins in mammary gland as a biopharmaceutical production system of proteic nature).

Schulz, D.¹, González-Chavarría I.¹; Maura-Pérez R.¹, Salgado E.¹, Cabezas O.I.², Hugues F.², Salas-Burgos A.M.³, Sánchez O.³, Toledo, J.R.¹

¹Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas; ²Departamento de Ciencias Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias; ³Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción.

La expresión de proteínas recombinantes de interés farmacológico en las células epiteliales de la glándula mamaria de animales de granja resulta una alternativa viable y costo-factible para la producción de biofármacos proteicos. Se han establecido los procedimientos para la transducción *in situ* de la glándula mamaria de animales de granja utilizando vectores adenovirales de primera generación. Con este sistema es posible obtener niveles de proteínas en el orden de los gramos por litro de leche los animales genéticamente transformados. Sin embargo, el periodo de producción de proteínas recombinantes solo tiene una duración de 7 días debido a la respuesta inmune del animal contra el vector adenoviral usado para la transformación genética. Una alternativa al uso de vectores adenovirales son los vectores virales adeno-asociados (AAV) que se utilizan ampliamente para la transferencia de genes *in vitro* e *in vivo* en células de mamíferos, demostrando una expresión del gen de interés hasta 2 años post-transducción. En el presente trabajo nos planteamos como objetivo la expresión sostenida en el tiempo de una variante quimérica de la eritropoyetina humana utilizando con vectores AAV para la transformación genética de la glándula mamaria. Se construyó un vector plasmidial de transferencia conteniendo la secuencia génica del biofármaco eritropoyetina, y se generaron vectores AAV recombinantes mediante co-transfección en la línea de empaquetamiento HEK-293-AAV. Los vectores obtenidos se utilizaron para transducir la glándula mamaria en modelos animales y se analizaron los niveles de producción de la eritropoyetina recombinante en leche mediante western-blot, durante el periodo de lactancia. Nuestros resultados demuestran que es posible utilizar vectores AAV para la producción de proteínas recombinantes de interés farmacológico en leche de mamíferos manteniéndose una producción sostenida en el periodo de lactancia y superior al uso de vectores adenovirales.

Agradecimientos: Fondef D09I1262.

Correo electrónico: danielschulz@udec.cl

Socio Patrocinante: Salas-Burgos, A.

P098. LA CONFORMACIÓN DE UNA VARIANTE QUIMÉRICA DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE POTENCIA SU ACTIVIDAD HEMATOPOYÉTICA (The conformation of a chimeric variant of recombinant human erythropoietin enhance its hematopoietic activity).

Salgado, E.¹, Fernández E.¹, Schulz D.¹, Hugues F.², Cabezas O.², Sanchez O.³, Salas-Burgos A.M.³, Toledo J.R.¹

¹Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos. Departamento de Fisiopatología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción, Concepción, Chile. ²Departamento de Ciencias Clínicas. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Concepción, Chillán, Chile. ³Laboratorio de Biofármacos. Departamento de Farmacología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

Las proteínas recombinantes de estructura compleja con aplicación biofarmacéutica deben producirse mayoritariamente en cultivos artificiales de tejidos, para obtener moléculas biológicamente activas. Por tanto se utilizan sistemas de expresión de alto costo y técnicamente exigentes. Un caso particular de estos biofármacos es la producción de eritropoyetina humana recombinante, la cual es utilizada ampliamente a nivel mundial como terapia contra patologías como insuficiencia renal crónica, anemia aplásica, y además en terapias de alta incidencia como el cáncer y el SIDA. Sin embargo, los sistemas productivos actuales basados en cultivos celulares conducen a que el fármaco tenga un elevado precio de mercado y una baja eficacia farmacológica. Por tal motivo el presente estudio, se basó en la expresión y purificación de una variante quimérica de eritropoyetina en un sistema de expresión alternativo en la glándula mamaria de cabra, que garantice un menor costo productivo y una farmacodinámica incrementada. Los resultados obtenidos sugieren, que la glándula mamaria es un sistema productivo capaz de generar hasta 4 gramos del biofármaco de interés por litro de leche y que dicha proteína puede ser purificada mediante métodos convencionales, estableciendo de forma viable el uso de animales como biorreactores vivos. Sin embargo, la actividad hematopoyética de la variante eritropoyetina humana recombinante resultó menos activa que su homóloga expresada en cultivos celulares.

Agradecimientos: -INNOVA BIO-BIO 12.215-EM.TES; LÍNEA PARA APOYAR LA REALIZACIÓN DE TESIS DE PRE Y POST GRADO. FONDEF D09I1262; Proyecto CONICYT de Inserción en la Academia N°79112029. Facultad de Ciencias Veterinarias (Universidad de Concepción)

Correo electrónico: emiliosalgado@hotmail.com

Patroncinante: Salas-Burgos, A.

P099. EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE INTERFERÓN ALFA HUMANO (Expression and characterization of human interferon alfa).

Ramírez-González, C.¹, Contreras M.¹, Retamal P.¹, Salas-Burgos A.¹, Farnos O.¹, Toledo Alonso, J.² y Sánchez-Ramos, O.¹

¹Laboratorio de Biofármacos Recombinantes, Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile. ²Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile.

El Interferón alfa (IFN α) se ha convertido en un importante agente terapéutico por su actividad antiviral, antiproliferativa e inmunomoduladora. En Chile, su uso está indicado para el tratamiento del virus de la hepatitis C. Sin embargo, su utilidad clínica se ve restringida por el corto tiempo de vida media de la molécula. En este trabajo se generó un vector de expresión para IFN α unido a un dominio de trimerización con el fin de lograr un aumento del tiempo de vida media de la molécula por un aumento su tamaño molecular. El vector fue clonado en la cepa *P.pastoris* MP36his3 auxotrófica para histidina. La obtención de cepas recombinantes para el gen de IFN α fue demostrado a través de PCR y Dot Blot de ADN. Luego de la inducción de la cepa MP36his3 con metanol, la proteína fue detectada mediante Western Blot. Se logró demostrar que la molécula se expresa en forma trimérica y a niveles superiores a los 100 microg/mL.

Agradecimientos: Proyecto FONDEF D10i1282 y Línea de financiamiento de apoyo a tesis de innova Bio Bio

Correo electrónico: consueloramirez@udec.cl

Socio Patrocinante: Salas-Burgos, A.

P100. USO DE CELL-SORTING ACTIVADO POR FLUORESCENCIA PARA EL AISLAMIENTO DE CLONES CELULARES PRODUCTORES DE FSH RECOMBINANTE. (Use of fluorescence-associated cell sorting for the isolation of highly producer cell clones of a recombinant FSH)

Bravo, F.¹, Teneb J.¹, Starck-Méndez, M. F.¹, Beltrán, C.¹, Mansilla R.¹, Alexis Salas-Burgos¹ Sánchez O.¹

¹Laboratorio de Biofármacos Recombinantes, Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

La infertilidad afecta aproximadamente al 10-15% de las parejas. Para aumentar las posibilidades de concepción, las técnicas de reproducción asistida han mejorado y, en los últimos 5 años, miles de bebés han nacido después de los procedimientos de fertilización in-vitro o de inyección intracitoplasmática de espermatozoides. Los protocolos para el uso de estas técnicas requieren de una apropiada hiperestimulación ovárica controlada. Hoy en día, la hormona FSH es el fármaco más utilizado para la inducción de la ovulación. La FSH es una proteína glicosilada con un peso molecular de 28 000-30 000 Da, normalmente secretada por la glándula pituitaria anterior. Las preparaciones recombinante de FSH (rhFSH) se caracterizan por un mayor nivel de pureza, la reducción de la variabilidad lote-a-lote y no se conoce riesgo de infección. Para desarrollar una plataforma productiva de FSH recombinante resulta necesario generar un clon celular altamente productor de la hormona. Sin embargo, lograr obtener un clon celular conlleva tiempos de desarrollo superiores a los 12 meses y un alto costo asociado. Para obtener el clon celular productor de manera rápida y eficiente, se diseñó un vector lentiviral para la expresión de una variante de FSH recombinante que incorpora además un reportero fluorescente (GFP) escindible mediante la incorporación de elementos de recombinación sitio-específica (loxP). Primeramente, se correlacionó el nivel de intensidad de fluorescencia (GFP) de diferentes clones con el nivel de expresión de FSH. Utilizando cell-sorting activado por fluorescencia se aislaron aquellos clones más fluorescentes, cultivados de manera independiente y se determinó su nivel productivo de FSH mediante ELISA. Utilizando la transfección de un plásmido que codifica para Recombinasa CRE, se detuvo la producción de fluorescencia en alrededor de un 14% de las células, quedando pendiente la evaluación del nivel productivo de FSH en clones no-fluorescentes aislados.

Agradecimientos: Proyecto INNOVA BIO-BIO 12.295-EM.TES

Correo electrónico: fbravoc@udec.cl

Socio Patrocinante: Salas-Burgos, A.

P101. CLONAMIENTO, EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE SUPERFICIE DEL VIRUS ANDES: GN Y GC. (Cloning, expression and purification of the Andes virus surface glycoproteins: Gn and Gc.).

Beltrán-Ortiz, C.¹, Fernández Y.¹, Starck-Méndez M.¹, Durán E.¹, Teneb J.¹, Bravo F.¹, Aedo G.¹, Mancilla R.¹, Ramírez-González C.¹, Contreras M.¹, Salas-Burgos A.¹, y Sánchez O.¹.

¹ Laboratorio de Biofármacos Recombinantes. Departamento de Farmacología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción.

Los Hantavirus causantes de Síndrome Cardiopulmonar (HPS, *de sus siglas en inglés*) poseen una letalidad asociada de entre 30 y 50%. Actualmente no existen vacunas ni tratamientos terapéuticos contra estos hantavirus. Una alternativa de tratamiento podría ser el empleo de anticuerpos capaces de unirse específicamente a la superficie viral, impidiendo la interacción con los receptores celulares y neutralizando la infección viral. La primera etapa de este abordaje, requiere de la expresión y purificación de las moléculas Gc y Gn. En el presente se lograron construir variantes secretables de los dominios extracelulares de Gn y Gc. Ambos genes fueron introducidos dentro del genoma de vectores adenovirales, a fin de asegurar altos niveles de expresión de ambas moléculas. Mediante la incorporación de una cola de 6 residuos de histidina ambas moléculas pueden ser eficientemente purificadas usando cromatografía de afinidad. Los resultados del presente trabajo constituyen el primer paso para disponer de las glicoproteínas Gn y Gc en cantidades suficientes para abordar el desarrollo de un fármaco para el tratamiento de pacientes infectados con el virus ANDES y podrían constituir la base para el desarrollo de una formulación vacunal contra hantavirus causantes de HPS.

Agradecimientos: Proyecto FONDECYT regular 1110925 y Línea de apoyo a tesis de Innova BioBio 12.223

Correo electrónico: camilaelbeltran@udec.cl

Socio Patrocinante: Salas-Burgos, A.

P102. CLONAJE, EXPRESION Y PURIFICACION DEL DOMINIO DE TRIMERIZACION DEL COLAGENO TIPO XV HUMANO (Cloning, expression and purification of the Human collagen XV trimerization domain).

Retamal-Sánchez, P.¹, Ramírez-González C.¹, Toledo Alonso J.², Salas-Burgos A.¹ y Sánchez-Ramos O.¹

¹Laboratorio de Biofármacos Recombinantes, Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile. ²Laboratorio de Biotecnología y biofármacos, Departamento de fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile.

Durante los últimos 30 años los biofármacos han demostrado ser una excelente alternativa para el tratamiento de múltiples patologías. Al igual que los fármacos de origen químico, el efecto terapéutico de los biofármacos depende en gran medida de su tiempo de vida media en circulación. Un aumento del tiempo de vida media puede significar no solo la administración de dosis menores, sino que también se traduce en un considerable ahorro económico para el paciente. Tomando como base este principio, las empresas biofarmacéuticas se esfuerzan en diseñar formulaciones terapéuticas que aseguren un mayor tiempo de duración del producto biofarmacéutico en circulación. Con este propósito se han creado formulaciones que aseguran la liberación lenta del producto activo y también se han producido moléculas conjugadas a polímeros (tipo polietilenglicol). Nosotros hipotetizamos que una alternativa viable y competitiva sería la agregación espontánea de moléculas de interés terapéutico, mediante su fusión a dominios de trimerización. Con este propósito, en el presente trabajo se exploró el potencial del dominio de trimerización de colágenos tipo XV (Colg3). En este trabajo se diseñó y sintetizó químicamente un gen que codifica el dominio de trimerización del colágeno XV fusionando 6 residuos de histidina en su región N-terminal. El gen fue clonado en el vector pEX-N-His y electroporado en la cepa de *E. coli* BL-21 DE3 C(+). La expresión de la proteína se indujo mediante el empleo de IPTG. En los cultivos inducidos se pudo detectar la expresión de Colg3 mediante electroforesis en SDS-PAGE y Western-blot. La molécula Colg3 fue purificada mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos. Se demostró que la molécula Colg3 recombinante se expresa en forma trimérica lo cual avala su empleo como potencial dominio de trimerización para el desarrollo de nuevos y mejores biofármacos.

Agradecimientos: FONDEF D1011282

Correo electrónico: pretamal@udec.cl

Socio Patrocinante: Salas-Burgos, A.

P103. “EMPLEO DE GENÉTICA REVERSA EN LA GENERACIÓN DE SISTEMA DE MINIGENOMAS BASADO EN VIRUS ANDES” (“Use of reverse genetics in the generation of a minigenome system based on Andes virus”).

Durán, E.¹, Starck-Méndez M.F.¹, Beltrán, C.¹, Fernández, Y.¹, Salas-Burgos, A.¹, Sánchez, O.¹

¹ Lab. de Biofármacos Recombinante, Dpto. de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción.

El Síndrome Cardiopulmonar causado por Hantavirus (SCPH) es una patología con una letalidad asociada entre 30-50%. El agente etiológico de esta enfermedad es un virus envuelto con un genoma de ARN trisegmentado de polaridad negativa denominados L, M y S. El segmento L codifica para una ARN polimerasa ARN dependiente; el segmento M codifica para las glicoproteínas de superficie Gn y Gc, y el segmento S codifica para la proteína de la nucleocápside NP, y para un pequeño péptido no estructural denominado NSs. Debido a su alta letalidad, la manipulación de hantavirus causantes de SCPH requiere del empleo de laboratorios de alta contención (BSL-3 o BSL-4). Así, es particularmente deseable poder contar con sistemas económicos y seguros que permitan estudiar una parte o todas las etapas del ciclo de vida del patógeno. El presente trabajo se enfocó en el empleo de genética reversa como una herramienta para la generación de minigenomas del virus Andes. Se construyeron vectores conteniendo cada uno de los segmentos genómicos del virus bajo el control de promotores de ARN polimerasa I. El genoma S fue modificado de forma tal que la secuencia codificante para la nucleoproteína viral fue sustituida por el gen de la Proteína Fluorescente Verde (GFP). Se construyeron además vectores de expresión conteniendo secuencias codificantes para NP, NSs y polimerasa L. El coctel de plásmidos fue transfectado en células HEK-293 y Vero-E6. Los eventos de generación de ARN viral fueron detectados mediante PCR y *Northern blot*. La expresión de GFP a partir del genoma S modificado también pudo ser detectada mediante observación directa al microscopio de fluorescencia y citometría de flujo. Nuestros resultados muestran que es posible emplear herramientas de genética reversa para generar minigenomas del virus Andes. Eventualmente el sistema podrá ser optimizado con el propósito de generar viriones incompetentes para la replicación.

Agradecimientos: Proyecto Fondecyt 1110925, Financiamiento de tesis INNOVA-BIOBIO 12.186 EM-TES

Correo electrónico: edduran@udec.cl

Socio Patrocinante: Salas-Burgos, A.

P104. CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS Y EXPRESIÓN DE TGF- β EN UN SISTEMA FORMULADO CON BIOPOLÍMEROS DE USO FARMACOLÓGICO: GELATINA/QUITOSANO/HIALURONATO

Brown, D.I.¹, Herrera H.^{1,2}, Weinstein-Opppenheimer, C.R.³, Acevedo C.A.⁴

¹Laboratorio de Biología de la Reproducción y del Desarrollo, Departamento de Biología y Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso. ²Escuela de Tecnología Médica, Universidad de Valparaíso. ³Departamento de Bioquímica, Facultad de Farmacia, Universidad de Valparaíso, Valparaíso. ⁴Centro de Biotecnología, Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso.

El tratamiento de lesiones agudas y crónicas de piel u otros factores, es un problema solo parcialmente resuelto. La Ingeniería de Tejidos apoyándose en la investigación básica en Biología Regenerativa, ha desarrollado soluciones terapéuticas mediante la combinación de biopolímeros de uso farmacéutico que asemejen la matriz extracelular, células sembradas en estas matrices y la manipulación de factores de crecimiento que actúan en la curación de las heridas. En esta investigación analizamos el crecimiento y expresión de TGF- β de fibroblastos sembrados sobre matrices de gelatina/quitosano/hialuronato construidas con distintas formulaciones.

Matrices biopoliméricas con concentraciones de Gelatina 0,8%, 1% y 1,2% (p/v); Quitosano 2% (p/v) en ácido acético 1% (v/v) y ácido hialurónico 0,01% (p/v) en una proporción de 7:2:1 (respectivamente); se sembraron 100.000 fibroblastos cultivados a partir de biopsias de dermis de piel de rata. Semanalmente triplicados de las distintas concentraciones y durante seis semanas fueron fijados en Bouin acuoso, sometidos a técnica histológica de rutina y teñidos con un método tricrómico. En cortes seriados de cada implante se cuantificó el número de células por niveles y se identificó, mediante técnicas inmunohistoquímicas de rutina utilizando Diaminobenzidina (DAB) como cromógeno, la presencia de las isoformas 1 y 3 del Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β).

Los resultados demostraron que la menor concentración de gelatina muestra un mejor crecimiento y sobrevivencia de células espacial como temporalmente dentro del biopolímero, y una mejor distribución hacia la zona media del implante. Independiente de la concentración de gelatina, los fibroblastos sembrados son capaces de secretar TGF- β 1 pero no TGF- β 3, lo que favorecería un microambiente enriquecido dentro de la matriz al momento de ser utilizado en Biología e Ingeniería Regenerativa.

Agradecimientos: Proyecto FONDECYT 1120166

Correo electrónico: donald.brown@uv.cl, cristian.acevedo@usm.cl

Socio Patrocinante: Weinstein-Opppenheimer, C.R.

P105. INFLUENCIA DEL PATRÓN DE GLICOSILACIÓN EN LA ACTIVIDAD HEMATOPOYÉTICA DE UNA VARIANTE QUIMÉRICA DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE (Influence of the glycosylation pattern in the hematopoietic activity of a recombinant chimeric variant human erythropoietin).

Fernández-Caniulén, E.¹, Salgado E.¹, Montesino R.¹, Maura-Pérez R.¹, Cabezas O.I.², Hugues F.², Salas-Burgos A.M.³, Sánchez O.³, Toledo J.R.¹

¹Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas. ²Departamento de Ciencias Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias. ³Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción.

Actualmente los biofármacos proteicos se producen mediante la tecnología de expresión recombinante. El correcto plegamiento y función de muchas proteínas de interés biofarmacéutico y estructuralmente complejas depende de un adecuado procesamiento post-traducciona, que varía dependiendo del sistema de expresión utilizado. La eritropoyetina humana (EPOh), que en su forma nativa presenta un patrón de glicosilación tetraantennario y tetrasialilado que determina su peso molecular, y en consecuencia su actividad hematopoyética. Esta glicoproteína solo puede producirse de forma recombinante, a un elevado costo, en células de mamíferos para obtener un patrón de glicosilación semejante a la proteína nativa; debido a que la expresión en organismos como bacterias, levaduras y plantas limitan sus modificaciones post-traduccionales, afectando su actividad biológica. En consecuencia, la glándula mamaria es un sistema de expresión alternativo para la producción de EPOh, ya que posee una alta capacidad secretora y modificaciones post-traduccionales propias de mamíferos. Sin embargo, se ha descrito que glicoproteínas expresadas en la glándula mamaria presentan un patrón de glicosilación reducido a estructuras di-antennarias y mono-sialiladas. En el presente estudio, se evaluó la actividad biológica de una variante quimérica de eritropoyetina humana expresada en la glándula mamaria de cabra, con un peso molecular triplicado, y purificada mediante cromatografía de afinidad a partir del extracto de suero de leche. La actividad biológica de la glicoproteína se evaluó mediante la cuantificación del incremento en los niveles de hematocrito en modelos murinos normocíticos. Los resultados obtenidos sugieren que la proteína recombinante expresada en la glándula mamaria de cabra, con bajos niveles de ácido siálico, así como la variante completamente deglicosilada expresada en cultivos celulares, presenta una disminución de su actividad biológica, independientemente del tamaño molecular incrementado. Lo que sugiere que el patrón de glicosilación nativo de la EPO es imprescindible para su correcto plegamiento, y además, para evitar su metabolización hepática.

Agradecimientos: FONDEF D09i1262; Proyecto CONICYT de Inserción en la Academia N°79112029.

Correo electrónico: edelfernandez@udec.cl

Socio Patroncinante: Salas-Burgos, A.

P106. NUEVAS ESTRATEGIAS PARA EL DISEÑO Y OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS DE INTERÉS BIOFARMACÉUTICO EN SISTEMAS HETERÓLOGOS DE EXPRESIÓN: SECRECIÓN FUNCIONAL DE VLP MULTIPROPÓSITO MEDIANTE EL USO DE UN INHIBIDOR DE PROTEASAS RECOMBINANTE DE LA FAMILIA BPTI-KUNITZ (New strategies for the design and production of biopharmaceutical proteins base on heterologous expression systems: functional VLP secretion using a recombinant protease inhibitor BPTI-Kunitz family).

Lamazares, E.¹, Fernández E.¹, Toledo J.R.¹, Gil D.F.¹, Mansur M.¹, García-Fernández R.¹, Sánchez O.², Salas-Burgos, A.M.², Farnós O.¹

¹Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas. ²Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas.

La vacunación/tratamiento contra enfermedades infecciosas o cáncer, utilizando VLP quiméricas, es un tema de gran relevancia en el campo de las ciencias farmacéuticas y la salud humana. El uso de VLP puede implicar que sean portadoras de epítopes para células B o T, con capacidad de inducción de respuesta celular y humoral específica/potente contra un patógeno o tumor a tratar. Nuestro grupo ha obtenido altos niveles de expresión de la proteína de la cápsida de un calicivirus no patógeno en humanos, en la levadura *Pichia pastoris*, capaz de formar VLP. La secreción de VLP al medio de cultivo a gran escala implica ventajas económicas/tecnológicas, por lo que en este trabajo hemos evaluado la secreción al medio de dos variantes mutiméricas de VPL utilizadas como modelos de factibilidad. Un inconveniente de este sistema es la degradación proteolítica, la cual fue detectada en nuestro estudio, generando bajos niveles de VLP funcionales. El empleo de cepas proteasa-, proteasas específicas, aditivos, o variantes de fermentación, no logró disminuir la degradación. Sin embargo, durante la producción de VLP a alta densidad celular se diseñaron nuevas estrategias utilizando una variante recombinante (rShPI-1A) de un inhibidor de proteasas de tipo BPTI-Kunitz de la anemona *Stichodactyla helianthus*. La presencia del inhibidor en el medio de cultivo en el momento de inducción de proteínas, así como el cultivo combinado de cepas que expresan el rShPI-1A y las VPL permitieron aumentar la protección contra la degradación. Se construyó una cepa que co-expresa el inhibidor y las VLP, logrando niveles de expresión hasta 150 mg/L. Las VLP fueron caracterizadas en cuanto a estructura cuaternaria y presencia de epítopes conformacionales. Los resultados proveen una nueva estrategia para la expresión y secreción de proteínas complejas de interés farmacéutico, para potencial uso preventivo y terapéutico en humanos, utilizando *P. pastoris* como sistema productivo.

Correo electrónico: elamazares@udec.cl

Socio Patroncinante: Salas-Burgos, A.

P107. CARACTERIZACIÓN Y EFECTO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CARGADAS CON PENTOXIFILINA SOBRE EL SISTEMA INMUNE ACTIVADO CON HEMOCIANINA EN RATONES (Characterization and effect of polymeric nanoparticles loaded with Pentoxifylline on immune system activation with Hemocyanin in mice).

Ramírez, P.¹, Ibarra P.^{1,2,3}, Vilos C.³, Kurte M.⁴, Carrión F.⁴, Pelissier T.⁵, Constandil L.^{1,2,3}

¹Laboratorio de Neurobiología, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile. ²Centro para el Desarrollo de la Nanociencia y Nanotecnología, Universidad de Santiago de Chile.

³Center for Integrative Medicine and Innovative Science, Facultad de Medicina, Universidad Andrés Bello. ⁴Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de los Andes. ⁵Programa de Farmacología Molecular y Clínica. Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Una de las principales aplicaciones de las nanopartículas poliméricas en medicina es su utilización como sistema de liberación prolongada de fármacos, que permite la reducción de la frecuencia de administración, fluctuaciones de los niveles plasmáticos y efectos secundarios, convirtiéndose en una estrategia terapéutica muy atractiva para tratamientos de larga duración y patologías crónicas, como las enfermedades autoinmunes. Se sintetizaron nanopartículas poliméricas de PHBV cargadas con Pentoxifilina (NPs-PTX), un inhibidor de la fosfodiesterasa no selectivo que presenta propiedades inmunosupresoras, y se estudió su efecto sobre el sistema inmunológico murino previamente activado con Hemocianina (Hem). Las NPs-PTX se caracterizaron en base a su forma (microscopía electrónica de transmisión), tamaño (Dinamic light scattering), eficiencia de carga y liberación del fármaco in vitro. La administración de NPs-PTX i.v (equivalente a 5 µg de PTX) se realizó 5 días después de la inyección de Hemocianina i.v (300 µg) y su efecto fue evaluado cuantificando los niveles séricos de IgM y citoquinas (ELISA) a los 7 y 14 días, respectivamente. Además se evaluaron subpoblaciones linfocitarias en esplenocitos obtenidos a los 14 días (Cítometría de flujo). La caracterización indica que NPs-PTX tienen un tamaño de 200 nm, de forma redonda y superficie lisa, con un porcentaje de carga cercano al 50%. En solución acuosa, el 70% del fármaco es liberado en 3 días. En cuanto al efecto de NPs-PTX, los resultados preliminares señalan que el aumento de los niveles de IgM, citoquinas (IL-4, IL-10 y TNF-α) y Linfocitos B, inducido por Hemocianina, tiende a ser revertido por la administración de NPs-PTX. Estos datos sugieren que las NPs-PTX podrían revertir la activación del sistema inmune observado en diversas patologías autoinmunes.

Agradecimientos: Fondecyt 1120952 y CEDENNA FB0807.

P108. EXPRESIÓN DE FRAGMENTO DE ANTICUERPO ANTI-VEGF TRIVALENTE EN *Pichia pastoris* (Expression of anti-VEGF single-domain antibody fragments trivalent in yeast *Pichia pastoris*).

Contreras, V.M.¹, Ramírez G.C.¹, Farnós V. O.¹, Lamazares A. E.¹, Salas B.A.¹, Sánchez R. O.¹

¹ Laboratorio de Biofármacos Recombinantes, Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

En los últimos años los agentes biológicos han tomado importancia como agentes terapéuticos, un ejemplo son los anticuerpos; moléculas utilizadas por su especificidad para tratar diversas patologías. La complejidad de estas moléculas y su tamaño hacen necesario utilizar sistemas de expresión complejos, que generan bajas cantidades de producto y de alto costo. Para subsanar este problema, se propone producir fragmentos de anticuerpos que al ser menos complejos molecularmente pueden ser expresados en levaduras. De este modo, en este trabajo se generan fragmentos variables de cadena única (scFv) anti- VEGF trivalentes en levaduras *Pichia pastoris* cepa MP36. Para esto se clonó el gen de interés en un nuevo vector llamado pOS que contiene regiones de homología con el promotor y terminador de AOX1. El nuevo vector construido (pOS-B20) se utilizó para transformar levaduras, y a continuación se indujo la expresión de la proteína con metanol al 1% por 72 horas. En paralelo se utilizó el vector pPS10 (de similares características) para clonar el gen de interés, obteniéndose el vector pPS10-B20, con el que se transformaron levaduras exitosamente y se está investigando la expresión de la proteína de interés mediante *western blot*.

En este trabajo se ha logrado construir los vectores de expresión necesarios, chequeándose mediante ensayos de restricción y secuenciación. También se han transformado levaduras con los vectores construidos, lo que se ha confirmado mediante PCR de ADN genómico de las levaduras recombinantes. Por último, se ha inducido la expresión de los fragmentos de anticuerpos en levaduras transformadas con pOS-B20, pero no se ha logrado detectar la proteína de interés.

De este modo, el presente trabajo propone una metodología alternativa para la producción de fragmentos de anticuerpos utilizando la levadura *Pichia pastoris* como sistema de expresión.

Agradecimientos: Proyecto FONDEF D10i1282

Correo electrónico: maangecontreras@gmail.com

Socio Patroncinante: Salas-Burgos, A.

P109. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FARMACOLÓGICOS DESACOPANTES DEL TRANSPORTE DE UREA EN *HELICOBACTER PYLORI* (Identification of Uncoupling Pharmacological Compounds of Urea Transport in *Helicobacter pylori*).

Cáceres-Delpiano, J.A.¹, Salas-Burgos, A.M.¹.

¹Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Helicobacter pylori es una bacteria conocida como el mayor agente etiológico de las patologías gástricas. Más del 50% de la población mundial, y un 80% en Chile, está infectada. Las terapias actuales incluyen antibióticos para los cuales se ha identificado una alta resistencia, como claritromicina que ha aumentado de un 9% a un 17.6% en 10 años. *H. pylori*, patógeno de alta comorbilidad y alta resistencia a terapia convencional, hace imperiosa la búsqueda de nuevos agentes farmacológicos. Análisis ontológico de 108 proteínas cristalizadas de *H. pylori*, nos han permitido seleccionar a nuestro blanco terapéutico Urel (PDB: 3UX4), proteína hexamérica transportadora de urea, proceso importante en la sobrevivencia y desarrollo de *H. pylori* debido a su rol en la neutralización del pH del estómago. Para Urel se desarrollaron modelos tridimensionales de la proteína a los pH 2, 6 y 7.4. Los modelos de proteína fueron ensamblados con membrana y simulados a los distintos pH por 20ns de dinámica molecular a 300K, 1 atm con el campo de fuerza CHARMM c36 y utilizando NAMD. Además, se analizó el mecanismo de transporte y la interfaz de unión de sus monómeros en unidad hexaméricas. Con estos análisis estructurales se diseñaron dos estrategias de inhibición del transporte por moléculas pequeñas: 1) la inhibición del transportador de urea y 2) el desacople de la formación del hexámero biológicamente funcional. A través de métodos bioinformáticos, como dinámicas moleculares y docking molecular, y en base a un grupo de moléculas tipo fármacos desde ZINC, se seleccionaron moléculas pequeñas "hits" con especificidad por 1) el canal central y 2) la interfaz de los transportadores del hexámero. Los resultados muestran que las moléculas seleccionadas al ser evaluadas en cultivos de cepas de *H. pylori* J99 en ensayos de viabilidad bacteriana actúan como posibles nuevos candidatos a fármacos contra esta bacteria patógena.

Agradecimientos: Proyecto CONICYT de Inserción en la Academia N°79112029

Correo electrónico: jcaceresd@udec.cl

Socio Patroncinante: Salas-Burgos, A.

P110. DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN SISTEMA PARA LA GENERACIÓN DE VIRIONES INCOMPETENTES PARA LA REPLICACIÓN BASADOS EN VIRUS ANDES (Design and evaluation of a system to generate replication-incompetent virus based in Andes virus).

Starck-Méndez, M.F.¹, Fernández, Y.¹, Beltrán-Ortiz, C.¹, Durán, E.¹, Bravo, F.¹, Salas-Burgos, A.¹, Sánchez, O.¹

¹Laboratorio de Biofármacos Recombinantes, Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Los *Hantavirus* son virus, transmitidos por roedores, de la familia *Bunyaviridae*, y se asocian a dos patologías principales: Fiebre hemorrágica con síndrome renal (HFRS), en el "viejo mundo", y Síndrome cardiopulmonar por hantavirus (HCPS), en el "nuevo mundo". En Chile, el agente etiológico de HCS es el virus Andes, cuyo principal reservorio es el roedor *Oligorizomys longicaudatus*. Actualmente no existen tratamientos, antídotos o vacunas para el tratamiento o prevención del síndrome causado por el hantavirus en nuestro país, y la única ayuda que es posible brindar a pacientes infectados es tratamiento de soporte. Debido a la peligrosidad de este virus, debe ser manipulado en condiciones de máxima seguridad, lo que implica disponer de laboratorios con equipamiento y personal especializado, con elevados costos de construcción, empleo y mantención no sólo para su estudio, sino principalmente para la generación de vacunas, tratamientos y antídotos. Utilizando herramientas de genética reversa y biología molecular, se diseñó un modelo para la generación de partículas virales, basadas en el virus Andes, pero incompetentes para la replicación, lo que posibilita su estudio, manipulación y utilización de una forma totalmente segura, abriendo también alternativas para el estudio, pruebas y desarrollo de antídotos y tratamientos contra este hantavirus. Los viriones incompetentes para la replicación serían producidos a partir de vectores que contienen las secuencias del genoma del virus Andes bajo el control de un promotor de ARN-polimerasa I, reemplazando una de las secuencias codificantes del genoma viral por el gen reportero GFP, y aportando en *trans* las secuencias codificantes para sus proteínas L y N, para posteriormente evaluar el funcionamiento del sistema utilizando técnicas como microscopía de fluorescencia para la detección de expresión de GFP y RT-PCR para detectar la presencia de ARN viral en células transfectadas con el sistema diseñado.

Agradecimientos: Proyectos FONDECYT Regular n° 1110925 e INNOVA Biobío n° 12.213-EM.TES

Correo electrónico: mstarck@udec.cl

Socio Patroncinante: Salas-Burgos, A.

P111. DISEÑO Y SÍNTESIS DE 3-AMINOACETIL-CUMARINAS-N-SUSTITUIDAS Y SU POTENCIAL ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA ENZIMA HISTONA DEACETILASA (Design and synthesis of 3-aminoacetyl-coumarins-N-substituted as potential histone deacetylase inhibitors).

Pardo-Jiménez, V.^{1,2}, Núñez-Vergara, L.J.¹; Díaz-Araya, G.A.³; Navarrete-Encina, P.A.²

¹Laboratorio de Farmacoelectroquímica, Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. ²Laboratorio de Química Orgánica Aplicada, Departamento de Química Orgánica y Fisicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. ³Laboratorio de Farmacología Molecular, Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Las histonas deacetilasas (HDACs) son una familia de enzimas dependientes de Zn^{+2} , involucradas en la expresión génica a través de la regulación de la transcripción. Los inhibidores de las HDACs (iHDACs), han demostrado tener efectos anticancerígenos, antiinflamatorios, antifibróticos, etc. La estructura de estos inhibidores se ajusta a un farmacóforo dividido en tres zonas: un grupo de unión al Zn^{+2} , un espaciador hidrofóbico con un largo de cadena de 5 a 6 metilenos o heteroátomos y una cabeza de grupo hidrofóbica. El grupo de unión al Zn^{+2} mas utilizado en la síntesis de iHDACs, es el ácido hidroxámico; sin embargo, este grupo es rápidamente metabolizado al derivado ácido carboxílico, disminuyendo su potencia inhibitoria, lo que ha incentivado la búsqueda de otros grupos quelantes más estables. Las modificaciones en la cabeza de grupo hidrofóbica con cumarinas, ofrecerían nuevos iHDACs más potentes y selectivos hacia estas enzimas. Las cumarinas y sus derivados son compuestos que han ocupado un lugar importante en la investigación de nuevos fármacos como una molécula *scaffold*, debido a sus múltiples actividades farmacológicas. Con el objetivo de desarrollar nuevos iHDACs, se sintetizó una serie de compuestos, usando el núcleo cumarina como cabeza de grupo, substituida en la posición 3 con un espaciador con diferentes grupos quelantes de Zn^{+2} : catecol, pirogalol y el grupo disulfuro. Se obtuvo el núcleo cumarina, a través de una reacción de Perkin modificada y posterior reacción de aminación de Gabriel. La condensación de los ácidos carboxílicos: gálico, pirogálico y lipoico, con el precursor amino-cumarina condujo a la obtención de los derivados finales. La introducción del núcleo cumarina, con grupos terminales reconocidos por su capacidad quelante de Zn^{+2} , permitiría estudiar la influencia de estas modificaciones en la potencia inhibitoria de las HDACs.

Correo electrónico: vivianapardo@ug.uchile.cl

P112. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE ELABORACIÓN DE MICROESFERAS DE PLGA CONTENIENDO DICLORHIDRATO DE PRAMIPEXOL (Optimization process for the production of PLGA microspheres containing pramipexole dihydrochloride).

Fuentes, C.¹; von Plessing, C.¹, Fernández, M.¹.

¹Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción.

El pramipexol es un agonista dopaminérgico no ergótico utilizado para el tratamiento de la Enfermedad de Parkinson. Debido a sus efectos adversos gastrointestinales y su dosificación, son frecuentes los problemas de adherencia al tratamiento. El desarrollo de una formulación de liberación sostenida del fármaco lograría disminuir estos inconvenientes, aportando además una estimulación dopaminérgica continua. Las microesferas son sistemas que pueden elaborarse con polímeros biocompatibles que modulan la liberación del fármaco, actuando además como reservorio de éste. El objetivo de este trabajo consistió en desarrollar una nueva formulación de diclorhidrato de pramipexol (PMX) mediante dos métodos de microencapsulación. Se elaboraron microesferas usando el copolímero ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA 50:50, Resomer 502®) mediante la técnica de emulsión/evaporación de solvente a partir de una emulsión O/W (método A) y a partir de una emulsión W/O/W (método B). La proporción de PMX/PLGA usada fue de 10 mg/200mg y 15/300 mg en el método A y B, respectivamente. Para optimizar cada método, se modificaron los siguientes parámetros: masa inicial de fármaco y polímero, concentración de tensioactivo y NaCl en fase acuosa y tiempo de aplicación de energía para formar la emulsión. Además, para el método B, se evaluó la influencia del volumen de fase orgánica. Las microesferas fueron caracterizadas por eficiencia de encapsulación y tamaño y distribución de tamaño de partícula. Los tamaños medios de las microesferas preparadas por los métodos A y B fueron $22,5 \pm 7,75\mu m$ y $20,3 \pm 11,48\mu m$, con coeficientes de dispersión de tamaño de partícula (Span) de 1,08 y 1,53, respectivamente. La eficiencia de encapsulación fue significativamente mayor para las microesferas preparadas por el método B ($60,9 \pm 8,9\%$) que para las preparadas por el método A ($45,0 \pm 5,2\%$). Se concluye que las microesferas desarrolladas presentan características de composición y tamaño que hacen factible su administración vía parenteral.

Agradecimientos: Proyecto DIUC N° 211.074.045-1.0. Dr. Pedro Toledo, Laboratorio de Superficies ASIF, Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad de Concepción.

Correo electrónico: constfuentes@udec.cl

Socio Patroncinante: von Plessing, C.

P113. NUEVA FORMULACIÓN DE SALIVA ARTIFICIAL PARA EL MANEJO DE LA XEROSTOMÍA (New formulation of artificial saliva for the treatment of xerostomia).

Beltrán, F.¹; Fernández, M.¹

¹Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción.

La xerostomía es un síntoma común en personas mayores que va asociado a distintas causales como: enfermedades autoinmunes, uso de fármacos, tratamiento para cáncer de cabeza y cuello, etc. El tratamiento de esta afección está enfocado a mitigar este síntoma y también, restablecer algunas funciones normales de la boca hidratándola y evitando alteraciones tales como: desgaste junto a desmineralización dental, fisuras bucales que derivan en infecciones microbianas, y halitosis. Actualmente en Chile, existe una muy limitada oferta de formulaciones de saliva artificial, las que presentan pobres propiedades organolépticas, por lo que se hace necesario investigar el desarrollo de nuevas formulaciones de substitutos salivales. La saliva artificial, normalmente, se compone de agua, electrolitos y algún polímero biocompatible con propiedades mucoadhesivas cuyo pH se encuentra entre 6,5 - 7. El objetivo de este trabajo, fue formular y elaboraron distintas formulaciones de saliva artificial, con el fin de obtener un producto lo más parecido a la saliva natural. Se ensayaron los siguientes polímeros mucoadhesivos: quitosano, quitosano lactato, carboxi-metil-celulosa de baja y media viscosidad, poli-vinil-pirrolidona, hidroxietil-celulosa, hidroxipropil-metil-celulosa, carbopol® 940, alginato sódico, ácido hialurónico, goma xantán y mucina de estómago de cerdo. Junto a esto, se hicieron combinaciones de 2 y 3 polímeros en solución. Las formulaciones fueron evaluadas de acuerdo a sus características organolépticas (olor, sabor y color) y reológicas. Se seleccionaron los siguientes polímeros: hidroxietil-celulosa, ácido hialurónico y polivinil-pirrolidona; estos polímeros presentaron las mejores propiedades organolépticas. La combinación, en diferentes proporciones, de estos tres polímeros seleccionados permitió obtener preparados sin sabor residual, transparentes e inodoros. Estos preparados presentaron flujo pseudoplástico y una viscosidad entre 22,5 – 5 mPa.s, cercana a la saliva natural (1,5-3,0 mPa.s), manteniendo sus propiedades mucoadhesivas. Se concluyó que el uso combinado de polímeros resulta una mejor estrategia que el uso de polímeros en solitario, permitiendo disminuir las concentraciones de éstos y mejorar sus propiedades organolépticas y físicas.

Agradecimientos: Proyecto VRID-Asociativo 212.074.048-1.0.

Correo electrónico: felipebeltran@udec.cl

Socio Patroncinante: Gómez, C.

P114. NUEVO SISTEMA DE LIBERACIÓN CONTROLADA PARA EL TRATAMIENTO DE *HELICOBACTER PYLORI* (New system of controlled release for *Helicobacter pylori* treatment).

Concha, C.¹; Fernández, M.¹; Pastene, E.¹

¹ Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción.

Helicobacter pylori (*Hp*) es un bacilo gram negativo, flagelado, que está fuertemente relacionado con enfermedades del tracto digestivo y ha sido una revolución en el tratamiento de estas desde su descubrimiento. Se estima que la prevalencia en Chile es de un 70%. Sin embargo, la terapia tradicional de erradicación de la *Hp*, tiene fuertes desventajas que hacen que se plantee una búsqueda de alternativas más naturales. Existe evidencia que avala la utilización de procianidinas como un agente anti-*Hp*, pues poseen la capacidad de neutralizar factores de virulencia como VacA y ureasa. Una fuente económica de obtención de estos compuestos es el orujo de uva, que siendo un desecho agroindustrial de la producción del vino, posee una composición rica en procianidinas, quercetina y canferol, estos últimos con efectos gastroprotectores. En el presente trabajo se realizó un extracto acuoso de orujo de uva de la cepa Pinot Noir, de la viña De Neira, ubicada en el sector Altos de Guarilhue, Región de Bío-Bío, Chile, donde a partir de 1 Kg de muestra, fue macerado en una solución etanólica, se filtró, centrifugó y realizó una extracción en fase líquida, luego concentrado y liofilizado, donde se obtuvo una masa final de aprox. 5g de extracto. El resultante fue cuantificado por el método DMACA, arrojando un 12% de procianidinas totales por cada 100 g de extracto. Además se identificó por HPLC- HILIC con detector de fluorescencia y HPLC-MS, el grado de polimerización y el perfil de procianidinas presentes arrojando cantidades de monómeros de Catequina 210,98± 1,26 µmol/g, dímeros de Procianidina B2 109,76± 2,65 µmol/g y trímeros de Procianidina C1 105,87 ± 6,45 µmol/g como los compuestos más relevantes presentes.

El extracto obtenido se empleó como principio activo en la formulación de micropartículas con recubrimiento polimérico mucoadhesivo, para el tratamiento de *HP*.

Agradecimientos: Proyecto Innova Bio-Bío, Código 13.1272 EM.TES (13.182).

Correo electrónico: conconcha@udec.cl

Socio Patroncinante: Pastene, E.

P115. SÍNTESIS DE ISOSALSOLINOL Y SU PURIFICACIÓN POR HPLC PREPARATIVO (Isosalsolinol synthesis and purification by preparative HPLC).

Valdivia, F., Berríos-Cárcamo P., Quintanilla M.E., Rivera-Meza M., Bustamante D., Israel Y.

Laboratorio de Farmacogenética del Alcoholismo, Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Diversos estudios sugieren que las propiedades reforzantes y placenteras del alcohol no se deberían a la molécula de etanol misma sino que al salsolinol, una molécula formada mediante la condensación del acetaldehído, un metabolito del alcohol, con la dopamina. Sin embargo, todos los estudios que apoyan esta hipótesis se han realizado con salsolinol comercial el cual se ha demostrado que contiene un 10% de isosalsolinol, cuya actividad biológica se desconoce. Para investigar si el isosalsolinol tiene actividad biológica es necesario sintetizarlo y purificarlo ya que no está disponible comercialmente. Los objetivos de este estudio son i) sintetizar isosalsolinol a partir de dopamina y acetaldehído, ii) purificar el isosalsolinol generado por HPLC preparativo, y iii) liofilizar el isosalsolinol para su conservación. La reacción de síntesis de isosalsolinol se realiza incubando dopamina (10mM) y acetaldehído (100 mM) a pH 7.4 a 37°C en oscuridad por 1 hora. La purificación del isosalsolinol de los componentes de la reacción se realiza mediante 2 etapas de HPLC: 1) separación inicial del isosalsolinol de la mezcla de reacción mediante columna C-18 SUPERCOSIL, y 2) purificación del isosalsolinol de los componentes de la fase móvil de la etapa anterior mediante columna β -ciclodextrina. Los resultados muestran que se puede sintetizar salsolinol e isosalsolinol a partir de la incubación de dopamina y acetaldehído. Al analizar la mezcla de reacción por HPLC-detector electroquímico, se encontró que el isosalsolinol genera un pico definido a un tiempo de retención aproximado de 37 min, que permitió su purificación mediante la colección de esta fracción. Las muestras fueron liofilizadas (presión: -0.9 bar, -50°C) durante 16 horas y se obtuvo isosalsolinol en estado sólido y se almacenó a -80°C para su uso en investigaciones orientadas a determinar sus efectos farmacológicos.

Agradecimientos: Proyecto FONDECYT 1130012 (MEQ)

Correo electrónico: Favg2177@gmail.com
equintanilla@med.uchile.cl

Socio Patroncinante: Quintanilla, M.E.

P116. MODULACIÓN GENÉTICA DE GLICOSILTRANSFERASAS EN CÉLULAS PRODUCTORAS DE BIOFARMACOS (*Genetic modulation of glycosyltransferases in biopharmaceutical producing cells*).

Leiva, M.J.¹, Jiménez S.¹, Montesino R.¹, Bravo F.², Saavedra P.¹, Cerro R.P.¹, Schulz D.¹, Salas-Burgos A.M.², Sánchez O.², Toledo J.R.¹

¹Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas. ²Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción.

Una gran proporción de las proteínas humanas con actividad reguladora y que resultan de interés farmacéutico requieren de modificaciones post-traduccionales (MPT) para alcanzar una adecuada conformación y actividad biológica. La glicosilación o adición de oligosacáridos a la secuencia de una proteína es una de las MPT más complejas y de mayor importancia para la actividad efectora de estas proteínas. El patrón de glicosilación de una glicoproteína puede variar dependiendo de la disponibilidad de oligosacáridos y enzimas del sistema de expresión utilizado, variaciones en éste afectan la farmacocinética, solubilidad e inmunogenicidad del biofármaco. Significativamente, las enzimas N-acetil-glucosaminil-transferasas IV y V (GNTasa-IV y GNTasa-V) son enzimas responsables de la formación de cadenas de azúcares multi-antenarias, que en casos como el de la eritropoyetina humana son esenciales para obtener una molécula recombinante con actividad hematopoyética. En la actualidad los cultivos artificiales de células de mamíferos son el sistema de expresión de preferencia de glicoproteínas debido a su capacidad de simular la glicosilación humana. A pesar de esto la heterogeneidad de glicofórmos obtenida con este sistema es una gran desventaja ya que son necesarios numerosos pasos de purificación para obtener glicofórmos homogéneos, con elevada actividad biológica. Resultados previos sugieren que la estructura ramificada de las cadenas de azúcares de las glicoproteínas puede ser controlada intracelularmente con la modulación de la expresión de las enzimas GNTasa-IV y V. El presente trabajo logra el diseño de un sistema de modulación genética de glicosiltransferasas en cultivos celulares productores de biofármacos, mediante la sobreexpresión de la enzima GNTasa-IV basado en el uso de vectores adenovirales de expresión dual, y utilizando como modelo a la molécula de eritropoyetina humana. Estos resultados muestran que es posible modular positivamente la ruta de glicosilación celular generando proteínas recombinantes con patrones de glicosilación más homogéneos y por tanto con una actividad biológica potenciada.

Agradecimientos: Innova apoyo a tesis 13. 166-EM.TES; Fondef D09I1262.

Correo electrónico: mariajeiva@udec.cl

Socio Patroncinante: Salas-Burgos, A.

P117. DETERMINACIÓN DE EFECTO ANTIFÚNGICO EN BRIÓFITAS DEL GRAN CONCEPCIÓN.

Paulina Contreras¹, Marcia Avello², Claudia Perez³

1: Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción. Casilla 237, Concepción, Chile. 2: Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción. Casilla 237, Concepción, Chile. 3: Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Chile.

En este trabajo se determinó el efecto antifúngico de Briófitas que crecen en ecosistemas cercanos a Concepción con el fin de encontrar nuevas fuentes de productos antifúngicos que son de amplia necesidad en diversas industrias del país (farmacéutica, alimentaria, agrícola, forestal, veterinaria, cosmética, etc.). Para esto se tomaron muestras en las localidades Hualqui y Quilacoya, las cuales presentan las condiciones climáticas favorables para el desarrollo de la planta y sus mecanismos defensivos antifúngicos. También se estudiaron muestras del musgo *Sphagnum magellanicum*, recolectadas en la región de Aysén, el cual tiene comprobado efecto antifúngico.

La actividad antifúngica se midió por la acción que tienen los extractos de las plantas en cultivos *in-vitro* de hongos patógenos que son de interés, y que se relacionan a las industrias mencionadas anteriormente.

Los extractos más activos fueron seleccionados para un estudio más en exhaustivo, donde se identificaron compuestos responsables de la actividad a través de cromatografía de gas acoplada a espectrómetro de masa.

El desarrollo del proyecto se está llevando a cabo en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia, en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Cs. Biológicas y en el laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Cs. Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción.

Correo electrónico: paucontrerasm@udec.cl ; maavello@udec.cl

Socio Patroncinante: Avello, M.

P118. ESTUDIO DE SIMULACIÓN MOLECULAR PARA DETERMINAR LOS MODOS DE UNIÓN DE SB-206553 A RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS Y COLINÉRGICOS (Binding modes of SB-206553 at serotonergic and cholinergic receptors: a molecular simulation study).

Reyes-Parada, M.¹, Moller P.², Contreras J.S.², Rojas C.², Alzate-Morales J.^{2,3}, Iturriaga-Vásquez, P.⁴

¹Escuela de Medicina, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Santiago de Chile. ²Centro de Bioinformática y Simulación Molecular (CBSM), Universidad de Talca, Chile. ³Escuela de Ingeniería en Bioinformática Universidad de Talca. ⁴Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) y los receptores de serotonina (5-HT) están involucrados en múltiples procesos fisiológicos y patológicos y además son blanco farmacológico de diversas drogas de uso clínico y/o recreacional. Por otro lado, la evidencia proveniente de la biología de sistemas indica que drogas promiscuas, es decir aquellas que actúan simultáneamente en varios receptores, presentan mejor eficacia clínica que aquellas que lo hacen de manera más selectiva. Sin embargo, el diseño racional de drogas promiscuas constituye un desafío complejo de abordar, particularmente cuando se pretende que los compuestos actúen sobre varios receptores cuya estructura, función y ligando endógeno son muy diferentes. Por ello, la evaluación de los modos de unión de drogas con afinidad por receptores diversos, aparece como una buena estrategia para facilitar dicho proceso de diseño.

En el presente trabajo, se determinaron los posibles modos de unión de la droga SB-206553 en receptores 5-HT_{2C} y α 7-nAChR. SB-206553 fue originalmente descrita como un antagonista 5-HT_{2B/2C} y más recientemente como un modulador positivo alostérico de α 7-nAChR. Para esto, se construyeron modelos por homología de ambos receptores, utilizando las estructuras cristalinas del receptor 5-HT_{2B} y de la proteína que liga acetilcolina (AChBP) como moldes, respectivamente. Posteriormente, utilizando metodologías de docking y dinámica molecular, se establecieron los modos de unión más probables del compuesto. Se discuten las principales interacciones moleculares en cada receptor. Esperamos que este tipo de análisis sirva para definir los aspectos estructurales y moleculares que dan cuenta de la alta afinidad de SB-206553, y a su vez faciliten el diseño racional de nuevos compuestos con actividad sobre ambos tipos de receptores.

Agradecimientos: Fondecyt 1130185 (MR-P), 1100542 (PI-V), 11100177 (JA-M).

Correo electrónico: miguel.reyes@usach.cl

Socio Patroncinante: Iturriaga-Vásquez, P.

INDICE DE AUTORES

A

Aballay, A.: 54
Abarca, J.: 40
Abreu, S.: 45
Acevedo, C.A.: 49, 94, 102
Acuña, R.: 73
Aedo, G.: 31, 89, 96, 98, 101
Aguayo, H.: 53
Aguayo, L.G.: 54
Águila, S.: 73
Aguilera, S.: 48
Agurto, R.: 55
Ahumada, U.: 52
Albornoz, F.: 94
Aliaga, E.: 53
Álvarez, R.: 74
Alvear, M.: 84, 85
Alvial, N.: 71
Alzate-Morales, J.: 109
Ambrosetti, A.: 43
Andrés, M.E.: 44
Aránguiz, P.: 35
Aranguren, A.J.: 81
Araos, P.: 74
Araya, G.: 53
Araya, J.: 51, 54, 55
Araya, K.A.: 40, 44
Araya-Maturana R.: 62
Ardiles, L.G.: 29
Arévalo, M.: 52
Arias, C.: 80
Arias, F.: 86, 87
Astudillo, L.: 83
Astuya, A.: 54
Avello M.A.: 84, 109
Avendaño, C.: 60, 61
Ayala, P.: 35, 65, 66, 67
Aylwin, C.: 69, 96

B

Bahamondes, V.: 48
Bahamondes, G.: 35
Barcia, E.: 44
Barra, R.: 34, 35, 72
Barrera, M.J.: 48
Barrera, N.: 71
Barria, F.: 29
Barrientos, L.: 84, 85
Barrios, L.: 53
Bastías, D.: 80
Beltrán, C.: 31, 96, 100
Beltrán, F.: 107
Beltrán-Ortiz, C.: 101, 105
Benavides, A.: 86
Berríos, M.: 91
Berríos-Cárcamo, P.: 108
Blohberger J.: 79
Boza, P.: 64, 67
Brandan, E.: 37

Bravo, F.: 96, 97, 98, 100, 101, 105, 108
Bravo, J.: 86
Bravo J.A.: 39, 76
Bravo, D.: 57
Brevis, F.: 60
Briceño, A.: 52
Brito, J.: 53
Brown D.: 49
Brown, D.I.: 94, 102
Bugueño-Valenzuela M.: 61
Burgos, H.: 55
Burgos, J.: 68
Burgos, R.A.: 68, 71, 74, 75
Buscaglia, M.: 43
Bustamante, D.: 43, 108
Bustamante, R.: 69, 70
Bustos, P.: 50

C

Caballero-Pohl, M.: 61
Cabezas O.I.: 98, 99, 103
Cáceres, D.D.: 90, 91
Cáceres, J.: 32, 97, 98
Cáceres-Delpiano, J.A.: 105
Calfío, C.: 53
Camilo, P.: 86
Campos-Estrada, C.: 70, 75
Carbonell, V.: 86
Cárdenas, M.V.: 75
Carrasco, H.: 83
Carreño, P.: 44
Carretta, M.D.: 68
Carrión, F.: 104
Carroza, A.: 89
Castillo, C.: 51, 54, 55
Castillo, R.L.: 80
Castillo, S.: 52
Castillo, V.: 82
Castro, C.: 87
Castro, I.: 48
Castro, V.: 62
Castro-Castillo, V.: 47, 51, 61
Catalán, M.: 35
Cayún, J.: 91
Cayupe, B.: 72
Cazanga, V.: 58
Cerde, A.: 77
Cerde, B.: 91
Cerde, C.: 57
Ceriani, R.: 94
Cerro, R.P.: 47, 63, 108
Chaminade, P.: 45
Chávez, C.: 87, 95
Cid, M.: 78
Cofré, C.: 55
Concha, J.: 94
Concha, C.: 107
Constandil, L.: 57, 58, 92, 93, 104
Contreras, E.: 60, 61
Contreras J.S.: 109

Contreras, L.: 79
Contreras, M.: 100, 101
Contreras, P.: 109
Contreras, V.M.: 104
Cornejo, P.: 78, 81
Cortés, K.: 52
Cortés, J.: 48
Cortez-San Martín, M.: 31, 96
Cremata, J.A.: 31
Cruz, G.: 34, 43, 56, 79
Cuevas, C.: 52

D

Dagnino-Subiabre, A.: 39, 56
Delgado, M.: 52
Delgado, R.: 43
Dellarossa, A.: 85
Delporte, C.: 86, 87
Díaz, A.: 65, 66
Díaz, P.: 53
Díaz, M.V.: 70
Díaz-Araya, G.A.: 30, 35, 38, 64, 65, 66, 67, 106
Díaz-Cisternas, P.: 53
Díaz-Merino C.: 76
Díaz-Véliz, G.: 52
Donoso, M.V.: 72, 73
Durán, E.: 101, 105
Dussaillant, G.: 89

E

Ehrenfeld, P.: 29
Enrione, J.: 49
Escalona, Y.: 71
Escobar, O.: 81
Escudero, N.: 81
Esparza, M.: 84
Espinosa, P.: 56
Estay, S.: 53
Etcheverry, A.: 40

F

Fajardo, V.: 85
Farfán, J.: 50
Farías, J.G.: 80
Farnos, O.: 100, 103, 104
Feliu, F.: 89
Fernández, B.P.: 90
Fernández, E.: 99, 103
Fernández, K.: 82
Fernández, M.: 44, 106, 107
Fernandez, P.: 73
Fernández, V.: 7, 78, 80, 81, 82
Fernández, Y.: 31, 101, 102, 105
Fernández-Caniulén, E.: 103
Fernández-Carballido, A.: 44
Fernandois, D.: 36
Ferreira, J.: 47, 61, 62
Figueroa, C.: 80, 87
Figueroa, C.D.: 29
Figueroa, D.F.: 54

Fischer, A.: 81
Flores, C.A.: 75
Flores, K.: 53
Forero, J.C.: 49
Fuentealba, J.: 51, 54, 55
Fuentealba, J.A.: 44
Fuentes, F.: 54
Fuentes, C.: 106
Fuentes, M.A.: 49
Fuentes-Retamal S.: 61, 62
Furrián, M.C.: 85

G

Gallegos-Caamaño, C.: 50
Gárate, J.: 89
García, L.: 64, 65, 66, 67
García, A.: 88
García-Fernández R.: 103
Garrido G.: 52
Garrido, G.: 83
Gentina, J.C.: 74
Gil, D.F.: 103
Godoy, B.: 91
Godoy, R.: 95
Godoy-Ramos, R.: 45
Gómez-Gaete, C.: 50, 95
González, I.: 95
González, M.: 78, 82
González, M.: 31, 51, 55
González, M.J.: 48
González, S.: 48
González-Arancibia, C.: 76
González-Chavarría, I.: 47, 63, 64, 99
González-Gómez, L.M.: 73
Gormaz J.G.: 89
Gotteland, M.: 76
Grandón, R.: 82
Guerra, M.: 43
Gutiérrez, F.: 32
Gutiérrez, F.A.: 96
Guzmán L.: 74
Guzmán, L.: 54
Guzmán-Rivera, D.: 61, 62
Gysling, K.: 40, 44

H

Hasson, D.: 89
Henríquez-Roldán C.F.: 94
Hernández, A.: 51, 55, 57, 58
Hernández-Cuevas, C.: 41
Herrera, A.: 52
Herrera, H.: 102
Herrera, S.: 94
Herrera-Marschitz, M.: 43
Hidalgo, J.: 48
Hidalgo, A.I.: 68
Hidalgo, J.I.: 75
Hidalgo, M.A.: 68, 71, 74, 75
Hirata, R.D.: 77
Hormazabal, N.: 89
Huenchuguala, S.: 52

Hugues, F.: 98, 99, 103
Huidobro-Toro, J.P.: 71, 72, 73
Humeres, C.: 64, 65, 66

I

Ibarra, P.: 58, 92, 104
Imbert, L.: 45
Inostroza, E.: 64, 65, 66
Israel, Y.: 108
Iturra, P.: 69, 70
Iturriaga-Vásquez, P.: 109

J

Jara, E.: 75
Jara J.: 61, 62
Jara, JA.: 47
Jiménez, S.: 51, 64, 95, 108
Jiménez, S.P.: 31, 55
Johansson, J.: 26, 33
Julio-Pieper, M.: 40, 76

K

Kemmerling, U.: 62, 75
Knox, M.: 74
Kramer, V.: 58
Kurte, M.: 104

L

Lamas, G.: 53
Lamazares A. E.: 104
Lamazares, E.: 103
Landaeta, R.: 64
Lara, H.E.: 34, 35, 36, 72, 79
Lara, R.A.: 91
Larrazabal, C.: 68
Laurido, C.: 57, 58, 93
Lavanderos, M.: 91, 92
Leiva, M.: 95
Leiva, M.J.: 63, 108
León, L.: 89
León, D.: 63
Letelier M.E.: 88
Leyton, C.: 48
Libong, D.: 45
Libuy, M.: 89
Loaiza, A.: 74
Lobos, N.: 59
Loiseau, PM.: 45
Loncoman, C.: 68
López J.: 58
López-Muñoz, R.: 42, 70, 75
López-Ortega, A.A.: 81
Luna S.L.: 36
Lux, S.: 59

M

Maccioni, R.B.: 57
Madrid-Rojas, M.: 47, 61

Maldonado, M.: 77
Maliqueo, M.: 26, 33
Mancilla, J.: 90
Mancilla, R.: 101
Mannerås L. 26, 33
Manosalva, C.: 71
Mansilla, R.A.: 31, 32, 96, 97, 98, 100
Mansur, M.: 103
Marchant, S.: 94
Mardones, L.: 77
Mardones, L.A.: 80
Matus, C.E.: 29
Maura R.
Maura-Pérez, R.: 31, 69, 96, 98, 99, 103
Maya, J.D.: 70, 75
Mayerhofer, A.: 33, 34, 79
Meléndez, C.: 52
Mella, S.: 90
Mena J.: 74
Mena, S.J.: 71
Méndez, A.: 69
Meneses, C.: 94
Meza, C.: 69, 97
Mezzano, S.: 25
Miranda, C.: 90, 91
Miranda, H.F.: 59
Molina, A.A.: 75
Molina, C.: 48
Moller, P.: 109
Moncada, N.: 77
Montero, E.: 60, 61
Montesino, R.: 31, 103, 108
Mora, S.: 52
Morales, B.: 55
Morales, F.E.: 84, 90
Morales, I.: 57
Morello, A.: 75
Morera F.J.: 75
Moya, PR. : 19
Moyano-Porcile, V.: 76
Müller-Sepúlveda, A.J.: 88
Muñoz, A.: 77
Muñoz, C.: 35
Muñoz, CA.: 48
Muñoz, P.: 52
Muñoz-Valdivia, S.: 51
Murillo, M.D.: 81

N

Naranjo, M.: 52
Navarrete, C.: 71
Navarrete-Encina, P.A.: 106
Navarro, K.: 87
Negro, S.: 44
Noriega, V.: 59
Nualart, D.: 29
Núñez-Vergara, L.J.: 106

O

Ojeda, L.: 63
Olmedo, I.: 35

Orellana, R.: 53
Ortiz, M.: 92
Ortiz, S.: 73
Osses, N.: 49
Oyarzun, M.: 92

P

Pardo-Jiménez, V.: 106
Paredes, A.H.: 34, 36
Paris, I.: 52
Parra, NC.: 47, 63, 64, 95
Pastene, E.R.: 84, 86, 87, 88, 107
Pavani, M.: 47
Pedemonte, J.C.: 82
Pelissier, T.: 57, 58, 92, 104
Peña, C.G.: 84
Peña, E.: 77
Peña, K.: 91
Peralta, F.A.: 53
Peredo L.: 47, 62
Pérez, A.: 63
Pérez C.: 109
Pérez C. I.: 54
Pérez, F.: 70
Pérez, M.A.: 39
Pérez-Acle, T.: 71
Pessoa jr A.: 80
Piñones, M.: 52
Piquer, B.: 35
Plaza, M.A.: 81
Ponce, C.A.: 69, 70
Ponce, N.: 70
Pozo, P.: 83
Prieto, J.C.: 59, 89
Pulgar, V.M.: 80

Q

Queirolo, C.: 65, 66
Quezada, C.: 85
Quintanilla, M.E.: 43, 108
Quiñones, L.: 90, 91
Quiroz, P.: 94

R

Ramírez, A.E.: 54
Ramírez, F.: 94
Ramírez, G.C.: 1
Ramírez, P.: 92, 104
Ramírez, L.: 43
Ramírez-González, C.: 100, 101
Ramos, C.: 89
Raso, S.: 72
Realini, O.: 76
Renard, G.M.: 40, 44, 56
Retamal, P.: 100
Retamal, J.: 58, 92
Retamal-Sánchez, P.: 101
Reyes, A.: 43, 58
Reyes, A.M.: 63
Reyes-Parada, M.: 109

Reyna, M.: 94
Ricu, M.: 79
Riquelme, R.: 56
Rivas, Cl.: 48, 77
Rivas, Z.: 61
Rivera-Meza, M.: 43, 108
Roa, F.J.: 48
Rocha, J.: 85
Roco, A.: 91
Rodrigo, R.: 89
Rodríguez, F.: 73
Rojas, C.: 109
Rojas, R.: 96
Rojas, S.: 78
Rojas, D.: 70
Rojas, R.A.: 89
Rojo, L.E.: 53
Romo, X.: 73

S

Saavedra, I.: 88, 90, 91, 92
Saavedra, J.: 62
Saavedra, P.: 69, 97, 108
Sáez, L.: 91
Sáez-Briones, P.: 51, 55
Salas, A.: 47
Salas, M.: 63
Salas-Burgos A.M.: 31, 32, 48, 63, 64, 69, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 108
Salazar L.A.: 77, 84, 85
Saldivia, S.: 89
Salgado E.R.: 31, 51, 99, 103
Salgado, M.: 60
Salinas, R.: 87
Sánchez, E.: 49, 94
Sánchez, O.: 31, 32, 55, 64, 69, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 108
Sánchez-Ramos, O.: 100, 101
Sandoval F.A.: 63
Sanhueza, L.: 93
Santana, R.: 65, 66
Santander, O.: 53
Sasso, J.: 90, 91, 92
Schulz, B.: 86, 87
Schulz, D.: 63, 99, 108
Segura-Aguilar J.: 52
Sepúlveda, M.J.: 60, 61
Silva, X.: 87
Silva, R.: 56
Siques, P.: 53
Slowing, K.: 44
Soliz, C.: 73
Sotes, G.: 54
Sotomayor, K.: 51, 55
Sotomayor-Zárate, R.: 40, 43, 44, 56
Squicciarini, V.: 90
Starck-Méndez, M.F.: 100, 101, 105
Stener-Victorin, E.: 26, 33
Streich, L.: 51

T

Tapia G.: 7
 Tapia, M.: 52
 Teneb, J.C.: 32, 97, 98, 100, 101
 Teuber S.: 75
 Toledo, A.J.: 31, 100, 101
 Toledo, J.R.: 31, 32, 47, 51, 55, 63, 64, 69, 95, 96, 97, 98, 99, 103, 108
 Toloza, P.A.: 84
 Torres, A.: 85
 Torres, E.: 88

U

Uribe, F.: 79
 Urra, F.A.: 62
 Urra, H.: 48
 Urra, J.: 79

V

Valdes, C.: 93
 Valdivia, F.: 108
 Valdivia, L.: 78
 Valencia, M.: 53
 Valenzuela, J.P.: 69
 Valenzuela-Barra G.: 87
 Varela, N.: 90, 91
 Vargas S.L.: 69, 70
 Vargas, R.: 78, 81, 82
 Vargas, Y.: 85
 Veloz, J.: 84

Vera, J.C.: 48, 77
 Vera, S.: 73
 Vicente, B.: 89
 Videla L.A. : 7, 78, 80, 81
 Villa, M.: 52
 Vilos, C.: 92, 104
 Vinet, R.: 74
 Vivar, R.: 35, 37, 64, 66
 von Plessing, G.C.: 90, 106

W

Weinstein, C.: 49
 Weinstein-Opppenheimer, C.R.: 94, 102
 Werling, D.: 27
 Wilkens, M.: 93

Y

Young, M.E.: 94

Z

Zambrano, A.: 63
 Zambrano, T.: 77
 Zaror S.A.: 31, 51, 55, 97
 Zeise, M.: 55
 Zepeda, A.: 80
 Zepeda, R.: 59
 Zúñiga, F.A.: 47, 64
 Zúñiga, M.E.: 94