
Anales

de la Fundación

Alberto J. Roemmers

Volumen XXIV

Libro de edición Argentina

Es propiedad
Derechos reservados.
© 2013, por la Fundación
Alberto J. Roemmers.
Buenos Aires, Argentina.
Queda hecho el depósito
que marca la ley 11.723

Impreso en la Argentina
Printed in Argentina
Libro de distribución gratuita
Prohibida su venta

Editado e impreso por
Ediciones Médicas del Sur S.R.L.
Junín 917 2º D - C.A.B.A.
ediciones@prensamedica.com.ar

INDICE

SUBSIDIOS 2009-2011

Introducción	13
BACTERIAS LÁCTICAS INMUNOMODULADORAS EN LA REGULACIÓN DE LAS ALTERACIONES HEMOSTÁTICAS INDUCIDAS DURANTE UNA INFECCIÓN RESPIRATORIA EN HUÉSPED INMUNOSUPRIMIDO POR DESNUTRICIÓN. MECANISMOS BÁSICOS DE ACCIÓN Bioq. Hortensia Zelaya, Bioq. Jonathan Laiño, Dra. Cecilia Haro, Dra. Graciela Agüero*	15
BASES MOLECULARES DE FENOTIPOS INUSUALES DE RESISTENCIA EN <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> Sonia Arduino, Jorgelina Smayevsky, Dolores García.	25
ESTUDIO DE LOS CAMBIOS FENOTÍPICOS EN CÉLULAS STELLATE HEPÁTICAS DE RATA ADULTA <i>in vitro</i> , ASOCIADOS AL MICROAMBIENTE Andrea Valeria Arnejo, Alejandra Hidalgo, Anselmo Adrian Bologna y Mariana Barbich	37
MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN ALFA2-ADRENÉRGICA EN CÉLULAS TUMORALES DE MAMA HUMANA. Ariana Bruzzone, Lucía Gargiulo, Cecilia Pérez Piñero, Lilian Fedra Castillo.	45
PARTICIPACIÓN DEL COMPLEMENTO CROMOSÓMICO SEXUAL (XX E XY) EN EL DIMORFISMO SEXUAL CARDIOVASCULAR Dra. X. E. Caerio	53

IMPORTANCIA DEL SISTEMA OPG (OSTEOPROTEGERINA), RANKL (LIGANDO DEL RECEPTOR ACTIVADOR DEL FACTOR NUCLEAR KB) Y TRAIL (LIGANDO INDUCTOR DE APOPTOSIS RELACIONADO CON EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL) EN TUMORES MAMARIOS HUMANOS. INFLUENCIA DE LAS CÉLULAS ESTROMALES DE MÉDULA ÓSEA. <i>Martínez LM*, Labovsky V*, Fernández Vallone VB, Hofer EL, Bordenave RH, Feldman L, Chasseing NA.</i>	65
IMPLICANCIAS DEL GEN EMR1 EN LA FUNCIÓN OVÁRICA <i>Ianina Ferder, Violeta A. Chiauuzi Fernanda Parboreli, Eduardo H. Charreau, Marta Tesone, Liliana Dain</i>	87
DIETA RICA EN HIDRATOS DE CARBONO SIMPLES DURANTE LA PEÑEZ, LA LACTANCIA Y LA POST LACTANCIA. EFECTO SOBRE ASPECTOS DEL METABOLISMO LIPÍDICO E HIDROCARBONATO EN LA DESCENDENCIA. <i>Chicco A, Lombardo Y</i>	97
AVANCES EN LA DETECCIÓN DE SÍNDROME DE CUSHING MANIFIESTO Y SUBCLÍNICO APLICANDO UNA METODOLOGÍA NO INVASIVA :CORTISOL EN SALIVA. PROPUESTA DE UN NUEVO ALGORITMO DIAGNÓSTICO EN PACIENTES ASISTIDOS EN UN HOSPITAL DE LA UBA <i>Liliana Noemí Contreras</i>	105
EL SISTEMA COLINÉRGICO NO NEURONAL COMO MODULADOR DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE FAVORECEN LA TRANSFORMACIÓN MALIGNA ANTE UNA SITUACIÓN INFLAMATORIA <i>Dr. Español, Alejandro Javier</i>	119
PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA DE ENDOCANNABINOIDES (AEA/ CBS/FAAH) EN LA REGULACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO (NO) Y LAS PROSTAGLANDINAS (PGS) EN PLACENTA HUMANA <i>Farina Mariana, Leguizamón Gustavo, Sordelli, Grassetti Mariana, Morales Ramona</i>	131

PARTICIPACIÓN DEL POLIMORFONUCLEAR NEUTRÓFILO EN LOS MECANISMOS DE LA INMUNOSUPRESIÓN ASOCIADA A PROCESOS SÉPTICOS <i>Fernández Gabriela Cristina; Barrera, Gabriela</i>	141
INTERACCIONES NEURO-INMUNO-ENDÓCRINAS EN EL TESTÍCULO <i>Rossi, Soledad Paola; Matzkin, María Eugenia; Terradas, Claudio; Ponzio, Roberto; Puigdomenech, Elisa; Levalle, Oscar; Calandra, Ricardo Saúl; Frungieri, Mónica Beatriz</i>	153
FISIOPATOLOGÍA DE LA SEPSIS POR <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> : ROL DE LAS CASCADAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR INDUCIDAS POR LA INTERACCIÓN DE LA PROTEÍNA A CON EL RECEPTOR DE TNF-A <i>Constanza Gai, Ailin Garofalo, Cintia González, Marisa I. Gómez</i>	157
MEDICIÓN DE LA RELACIÓN DE EXPRESIÓN DE GENES APOPTÓTICOS <i>BAX/BCL-XL</i> EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (LMC) <i>Mariana Selenia Gonzalez, Patricia Gargallo, Irene Larripa</i>	171
ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA/SUSCEPTIBILIDAD AL DESAFÍO CON <i>TRICHINELLA SPIRALIS</i> EN RATONES DE DISTINTO GENOTIPO. ESTUDIO DEL PERFIL TH1/TH2 EN LA ETAPA AGUDA DE LA INFECCIÓN <i>Lucila I. Hinrichsen, María Delia Vasconi, Natalia Panero Schipper, Ana V. Codina, Ricardo J. Di Masso</i>	183
BASES FISIOLÓGICAS Y MOLECULARES PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES OVÁRICOS <i>Dra. Griselda Irusta, Dra. Fernanda Parborell y Dra. Dalhia Abramovich</i>	193
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENOTIPOS DE <i>HELICOBACTER PYLORI</i> EN ESPECÍMENES BUCALES MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA <i>Medina, Myriam L, Romero Silvana, Anríquez Cristina, Marín Héctor</i>	

<i>M, Medina Marcelo G, Lamas Gabriela S., Billordo Ariel, Mosqueda Nancy, Merino Luis A</i>	197
LA HISTAMINA COMO MODULADOR DE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE LEYDIG TESTICULARES. MEDIADORES INTRACELULARES INVOLUCRADOS Y POSIBLE PAPEL EN LA ETIOLOGÍA TUMORAL <i>Carolina Mondillo</i>	211
REGENERACIÓN DE CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS UTILIZANDO OLIGONUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS QUE ESTIMULAN LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES ADULTAS Dr. Alejandro Montaner, Dra. Victoria Lux-Lantos, Dra. Silvia Bianchi, Lic. Andrés Hernando Insúa	217
UN NUEVO ROL DEL SISTEMA ANGIOTENSINÉRGICO: SU PARTICIPACIÓN EN LA INVOLUCIÓN MAMARIA POSTLACTANCIA <i>Karen A Nahmod</i>	231
ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON ASMA POR ANTÍGENOS BACTERIANOS <i>Constanza Otero</i>	241
POSIBLE ESTRATEGIA TERAPÉUTICA PARA LA PREVENCIÓN DEL SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA (OHSS) <i>Dra. Fernanda Parborell (Directora); Lic. Leopoldina Scotti (becaria); Dra. Dalhia Abramovich (becaria)</i>	251
POTENCIAL ROL DE LA HISTAMINA COMO RADIOPROTECTOR DE LA ESTRUCTURA Y FUNCIONALIDAD DE LA GLANDULA SUBMAXILAR <i>Prestifilippo, JP, Ph.D; Prof Ph.D Juan Carlos Elverdin y Ph.D Vanina Medina</i>	259
ROL DEL ONCOGÉN K- RAS EN LA CARCINOGENESIS BUCAL <i>Álvarez R., Abrigo M., Calb D., Raimondi Ana R.</i>	273

DESARROLLO DE UN NUEVO TRATAMIENTO PARA LA OSTEOPOROSIS. COMBINACIÓN DEL CONTROL METABÓLICO DE LA REMODELACIÓN ÓSEA CON DROGAS OSTEOGÉNICAS Y ANTIRRESORTIVAS <i>María L Brance, Lucas RM Brun, Maela Lupo, Hilda S Moreno, Alfredo Rigalli</i>	285
CARACTERIZACIÓN DE LA SÍNTESIS Y/O ACUMULACIÓN DE HEPARÁN SULFATO EN EL OVOCITO DURANTE SU MADURACIÓN Y SU PAPEL EN LA DESCONDENSACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE <i>Dra. Marina Romanato, Lic. Vanina Laura Julianelli</i>	293
INMUNIDAD INDUCIDA POR CEPAS DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> PREVALENTES EN ARGENTINA: RECEPTORES Y MOLÉCULAS INVOLUCRADAS EN EL PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS ²⁹⁹ <i>Bqca. María Mercedes Romero</i>	299
FACTORES GENÉTICOS PREDISPONENTES AL DESARROLLO DE ANTICUERPO INHIBIDOR DEL FACTOR VIII TERAPÉUTICO EN PACIENTES CON HEMOFILIA A <i>Liliana Carmen Rossetti, Miguel Candela</i>	313
ESTUDIO DEL PERFIL INMUNOLÓGICO DURANTE EL CRECIMIENTO DE UN TUMOR DE MAMA TRANSPLANTABLE EN UNA LÍNEA ENDOCRIADA DE RATÓN SELECCIONADO POR CONFORMACIÓN CORPORAL <i>Dra. Viviana Rosa Rozados; Dr. Di Masso Ricardo José, Dr. Zacarías Fluck Mariano, Dra. Scharovsky Olga Graciela, Dra. Rico María José. Alumnos colaboradores: Cáceres Juan Manuel, Pagura Lucas</i>	327
ROL DE LOS ESTEROIDES GONADALES EN EL DESARROLLO DE TERATOMAS OVÁRICOS EN RATONES TRANSGÉNICOS HIPERSECRETORES DE HCG <i>Betina Gonzalez, Laura D. Ratner, Susana B. Rulli</i>	341

REGULACIÓN NEUROENDOCRINA DE LA RESPUESTA INMUNE:
ACETILCOLINA COMO MODULADOR AUTÓCRINO Y PARÁCRINO
DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Gabriela Salamone

353

ESTUDIO *IN VIVO* DE LA RESPUESTA ANTITUMORAL
DESENCADENADA POR LA INMUNOTERAPIA DIRGIDA CONTRA
LA PROTEÍNA TRANSDUCTORA DE SEÑALES Y ACTIVADORA DE
LA TRANSCRIPCIÓN 3 (Stat3)

Mercedes Tkach, Martín Rivas, Roxana Schillaci

363

DESARROLLO DE NUEVOS COMPUESTOS DE ORIGEN NATURAL
EN EL TRATAMIENTO DE INFLAMACIONES BRONQUIALES, BAJO
EL MODELO DE LA FIBROSIS QUÍSTICA

Adrián Alberto Vojnov

373



ALBERTO J. ROEMMERS

1890 - 1974



FUNDACIÓN
Alberto J.
ROEMMERS

Creada por
Doña Candelaria N. Wolter de Roemmers e hijos
en el año 1975

Presidente
Dr. Rodolfo F. Hess

Vice-Presidente
Dr. Manuel Luis Martí

Secretario
Dr. Julio A. Bellomo

Vocales
Sr. Eduardo A. Macchiavello
Sr. Alberto Roemmers
Sr. Alejandro Guillermo Roemmers
Sr. Alfredo Pablo Roemmers
Dr. Miguel de Tezanos Pinto

Fiscalizadores
Dr. Eduardo L. Billinghamurst
Dr. Carlos Montero



INTRODUCCIÓN

En este volumen se publican los subsidios del Período 2009-2011, se han volcado todos los informes finales de los grupos de investigación que desarrollaron sus tareas en ese lapso.

Con esta publicación la Fundación Alberto J. Roemmers mantiene su compromiso, adquirido hace más de treinta y cinco años, de apoyar a la investigación médica en nuestro país a través de subsidiar planes rigurosamente seleccionados todos los años.

Se han visto beneficiados más de 1.000 grupos de trabajo, a lo largo de todo el país, en temas de Investigación Básica, Aplicada y de Epidemiología y Salud Pública.



BACTERIAS LÁCTICAS INMUNOMODULADORAS EN LA REGULACIÓN DE LAS ALTERACIONES HEMOSTÁTICAS INDUCIDAS DURANTE UNA INFECCIÓN RESPIRATORIA EN HUÉSPED INMUNOSUPRIMIDO POR DESNUTRICIÓN. MECANISMOS BÁSICOS DE ACCIÓN

Bioq. Hortensia Zelaya, Bioq. Jonathan Laiño,
Dra. Cecilia Haro, Dra. Graciela Agüero*

Instituto de Bioquímica Aplicada-Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia-UNT.

INTRODUCCIÓN

Durante mucho tiempo el sistema de la coagulación se consideró una entidad completamente separada de la respuesta inmune innata que sólo permitía prevenir o limitar la pérdida de sangre. Frente a diferentes agentes infecciosos, la activación de la coagulación y la subsecuente formación de depósitos de fibrina son esenciales en la defensa del huésped para confinar a los microorganismos y evitar su diseminación (1,2).

Los probióticos son definidos como microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren efectos benéficos para la salud del huésped (3). Las bacterias lácticas probióticas poseen comprobada acción inmunomoduladora (4, 5) y propiedades antiinflamatorias (6, 7). Asimismo se ha demostrado que la administración de una dieta de renutrición suplementada con *Lactobacillus casei* CRL 431 a ratones desnutridos e infectados con *Streptococcus pneumoniae*, favoreció la depuración del patógeno, moduló la respuesta inflamatoria con menor daño pulmonar y aceleró la recuperación de parámetros hemostáticos básicos (8, 9, 10).

Nuestro objetivo fue investigar si la administración de *Lactobacillus casei* CRL 431 modula los aspectos pro-inflamatorios de la coagulación en un modelo de ratones desnutridos e infectados.

Modelo experimental

Microorganismos

Lactobacillus casei CRL 431 fue obtenido colección de cultivos de CERELA (Chacabuco 145, San Miguel de Tucumán, Argentina).

Streptococcus pneumoniae serotipo 14 (Sp) fue adquirido de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud ANLIS "Dr. Malbrán", Buenos Aires, Argentina.

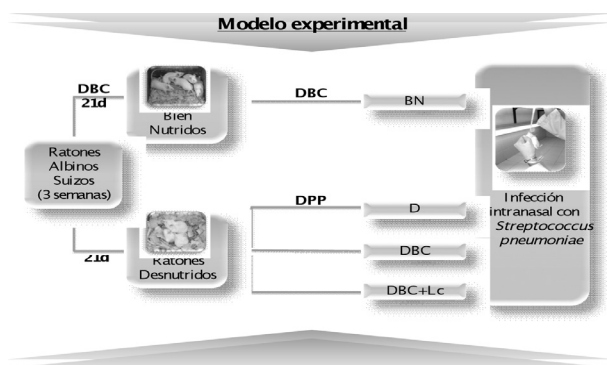
Modelo animal

Se emplearon ratones Albino Suizos machos de 6 semanas de edad provistos por el bioterio de CERELA.

Para obtener los ratones desnutridos (D), los animales al destete fueron alimentados con una dieta pobre en proteínas (DPP) durante 21 días. Los ratones desnutridos fueron separados en dos grupos para tratamientos de renutrición: un grupo de ratones recibió dieta balanceada convencional durante 7 días consecutivos (DBC) y otro grupo recibió 7 días de DBC suplementada con *Lactobacillus casei* (10^9 UFC/ratón/día) los dos últimos días del proceso de renutrición (DBC+Lc).

Infección experimental

El desafío con Sp fue realizado al final de la dieta de desnutrición en el grupo D y al finalizar las dietas de renutrición en los grupos DBC y DBC+Lc. Las muestras de sangre y lavado bronco-alveolar (LBA) fueron obtenidas el día 0 (antes de la infección) y a los 0,5; 1; 5 y 10 días postinfección (dpi).



Estudios a nivel pulmonar.

Evaluación de los depósitos de Fibrina en pulmón (Inmunohistoquímica)

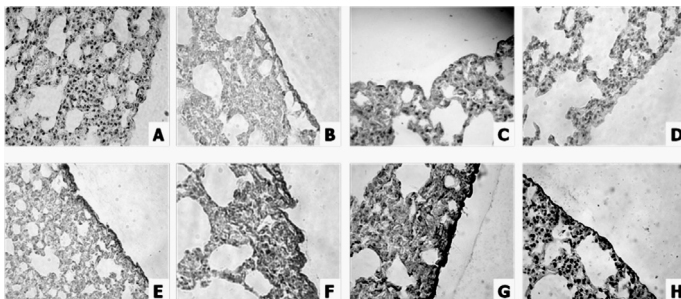
La reacción fue analizada teniendo en cuenta la intensidad (clasificada como ligera, moderada o fuertemente positiva) y distribución de los depósitos en el tejido pulmonar.

La desnutrición indujo la formación de depósitos de fibrina en pleura. La infección promovió aumento de intensidad y extensión de la reacción.

En los ratones BN, la infección indujo formación de fibrina en el parénquima con moderada intensidad y patrón focal.

El grupo DBC mostró comportamiento similar a D, mientras que en

DBC+Lc la reacción se limitó a la zona pleural sin alterar el parénquima pulmonar.



Presencia de depósitos de Fibrina en cortes histológicos de pulmón mediante Inmunohistoquímica contracolorado con Hematoxilina (40x).

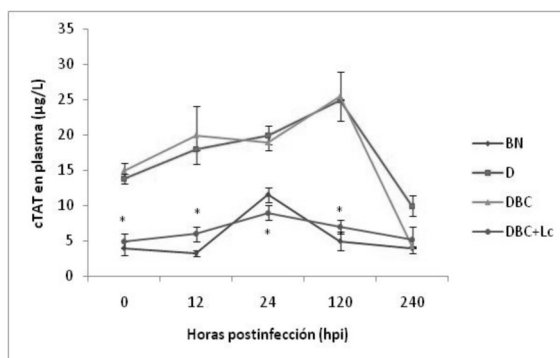
A, B, C y D: grupos BN, D, DBC y DBC+Lc antes de la infección (0 hpi).

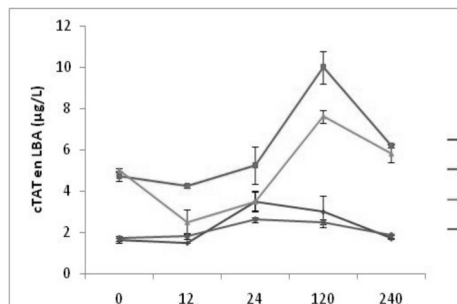
E, F, G y H: grupos BN, D, DBC y DBC+Lc a las 240 hpi.

Parámetros hemostáticos

Estado de activación de la coagulación (ELISA)

La desnutrición por sí misma indujo, en plasma y lavado broncoalveolar (LBA), mayores niveles de los complejos Trombina-Antitrombina (cTAT) evidenciando activación de la coagulación. La renutrición promovió un descenso significativo de estos complejos sin llegar a la normalidad. Luego de la infección, todos los grupos evidenciaron aumento de los mismos en LBA y plasma. El grupo suplementado con *L. casei* mostró comportamiento similar al grupo control normal.





Actividad de los factores de la coagulación (Métodos coagulométricos)

La desnutrición indujo descenso de la actividad de Factor II. En los tiempos posteriores a la infección se observó incremento de la misma, alcanzando valores similares a los otros grupos experimentales los cuales no evidenciaron cambios durante todo el período estudiado.

Los factores V, VII y X no fueron modificados por la desnutrición pero se observaron descensos significativos en algunos tiempos postinfección, destacándose el grupo D el cual mostró los menores valores.

El Fibrinógeno plasmático estuvo descendido en los animales desnutridos. El desafío con el patógeno promovió aumento significativo de su concentración a las 120 hpi, mientras que el grupo *L.casei* oral lo hizo a las 24 hpi. Durante todos los tiempos experimentales los ratones desnutridos mostraron concentraciones de Fibrinógeno significativamente menores.

Los niveles de factor VIII estuvieron significativamente disminuidos en los animales alimentados con la dieta hipoproteica. La infección indujo un descenso inicial seguido por un incremento que normalizó al final del experimento. Estas variaciones indicarían su comportamiento como factor procoagulante y como reactante de fase aguda.

Inhibidores del sistema de la coagulación (Sustrato cromogénico).

La Proteína C Activada (PCA) estuvo disminuida en LBA y plasma de ratones con déficit proteico. Se observó también que el desafío con el patógeno no indujo aumento de la misma en este grupo de animales, mientras que los tratados con la bacteria láctica y los controles normales mostraron incremento durante la infección.

La AT mostró niveles significativamente descendidos por la desnutrición, mientras que la suplementación con *L.casei* normalizó este parámetro.

Recuento de Plaquetas: La desnutrición no indujo modificaciones del

recuento plaquetario durante todo el período evaluado. Después del desafío infeccioso los grupos que recibieron *L. casei* y controles normales evidenciaron aumento de las mismas a las 12 hpi.

Parámetros involucrados en la respuesta inmune innata

Reactantes de fase aguda

La desnutrición indujo niveles significativamente superiores de Proteína C reactiva ultrasensible (PCRu) y α -glicoproteína ácida (GPA). Sólo los animales del grupo *L. casei* oral mostraron valores normales el día previo a la infección. El desafío con el patógeno incrementó los valores de PCRu y GPA en todos los grupos experimentales, sin embargo el grupo *L. casei* oral mostró niveles significativamente menores durante todos los tiempos evaluados.

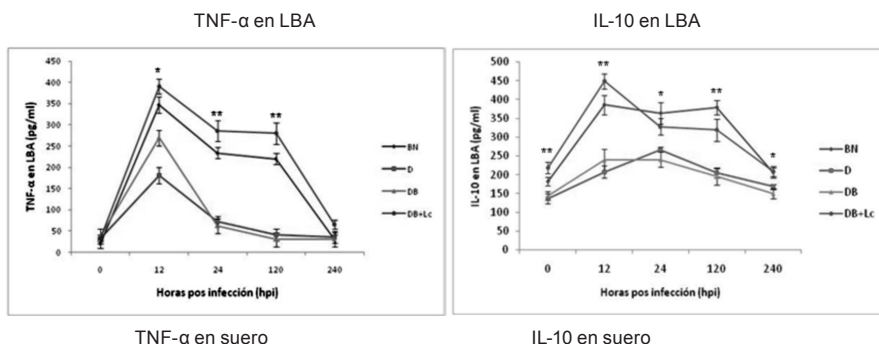
El incremento de los reactantes de fase aguda tiene efecto directo en la activación de la coagulación. En este modelo experimental, observamos que la desnutrición y el proceso infeccioso inducen aumento de los reactantes de fase aguda. La administración del lactobacilo estudiado permite modular la producción de los mismos, contribuyendo a controlar la activación de la coagulación

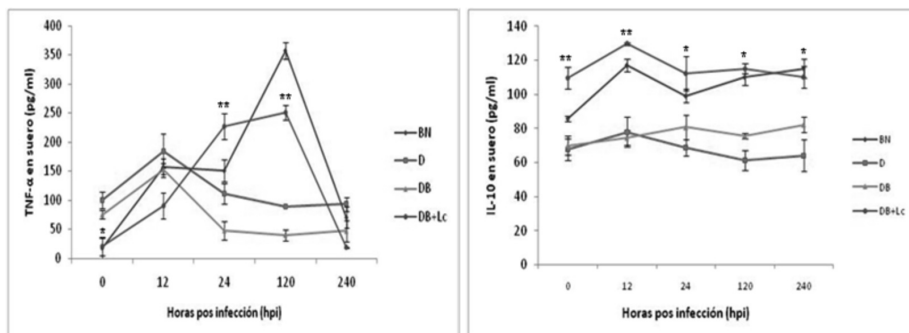
Citoquinas en suero y LBA (ELISA)

La desnutrición indujo incremento de TNF- α en suero y sólo la dieta suplementada con Lc normalizó los valores de esta citoquina.

En los tiempos posinfección todos los grupos mostraron incremento de TNF- α , retornando a los valores iniciales al final del experimento.

La desnutrición indujo disminución de IL-10, deficiencia que no fue corregida por la renutrición. La infección provocó aumento de IL-10 sólo en los animales de los grupos BN y DBC+Lc.





Discusión:

Estudios previos demostraron que el efecto modulador de las bacterias probióticas sería consecuencia de su capacidad para inducir la secreción de un adecuado patrón citoquinas lo que estaría mediado, en gran parte, por componentes de la pared celular (11,12)

Estos componentes inducen una respuesta a través de su reconocimiento por Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs) tales como los *Toll-like receptors* (TLR) expresados sobre células inmunes. Señales intracelulares desde estos receptores resultan en la modulación de la producción de citoquinas (13).

Ha sido demostrado también que las citoquinas inducidas por la administración oral de bacterias lácticas pueden ser liberadas a la sangre e provocar la estimulación de una respuesta inmune sistémica. Por ello la respuesta inmune inducida a nivel de intestino delgado puede diseminarse a través del sistema inmune y alcanzar otros sitios. Así, es posible que algunas células, por su movilización desde los sitios inductivos puedan dirigirse y localizarse en el tracto respiratorio y estimular células inmunes locales (14,15)

Los resultados obtenidos demuestran que en nuestro modelo experimental la desnutrición induce un estado inflamatorio de bajo grado, demostrado por los niveles de TNF- α , e IL-10. Similares observaciones fueron informadas por Ling et al en ratas desnutridas. (16)

El estado inflamatorio detectado en los ratones desnutridos induciría un bajo grado de activación de la coagulación evidenciado por elevados niveles de cTAT y deterioro de los mecanismos reguladores, comportamiento que se acentuó después de la inducción de la infección.

La renutrición con una dieta suplementada con *Lactobacillus casei* fue

beneficiosa ya que contribuyó con un temprano reclutamiento de leucocitos e indujo, a nivel local y sistémico, un patrón de citoquinas similar al del control normal. Asimismo contribuyó a limitar la activación de la coagulación y normalizar las proteínas reguladoras

El efecto preventivo de *Lactobacillus casei* estaría mediado por su capacidad para modular la liberación de citoquinas pro y antiinflamatorias, regulando la respuesta inflamatoria y la activación de los sistemas hemostáticos

ABSTRACT

Abstract: Malnutrition induces a decrease in immunity that affects the ability of the organism to deal with an infectious challenge. The clotting system is considered a branch of immunity and its activation is important in the pathogenesis of an infectious disease. This work was conducted to determine coagulation modifications in malnourished hosts before and during infection. Weaned mice were malnourished via a protein-free diet. Well-nourished control mice (WNC) consumed a balanced conventional diet. Malnourished mice (MN) and WNC were challenged intranasally with *Streptococcus pneumoniae*. Blood, bronchoalveolar lavages (BAL), and lung samples were taken at different times post infection. The results were that MN showed altered hemostatic tests and fibrin(ogen) deposits in the lung. Thus, an increase in thrombin–antithrombin complexes (TATc) in plasma and BAL was observed. In the MN group, infection induced a rise in TATc in plasma and BAL and increased plasma fibrinogen and fibrin(ogen) deposits in the lung. A decrease in activated protein C and antithrombin in BAL and an early decrease followed by an increase in plasma Factor VIII were also observed. Also MN demonstrated high levels of acute phase reactant and an increase in TNF- α . The feeding with a diet supplemented with *Lactobacillus casei* induced an anti-inflammatory cytokine pattern which contributed to limit coagulation activation and to normalize the regulatory protein

These findings will help to develop further strategies to reduce the damaging effects of clotting and enhance its beneficial contribution to immune reactions.

Key words: malnourishment, blood coagulation, plasma, bronchoalveolar lavage, coagulation activation, coagulation inhibitors, TAT complexes.

BIBLIOGRAFIA

1. Opal SM and Esmon CT. Bench-to-bedside review: functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis. *Crit Care* 2003, 7(1):23-38.
2. Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van der Poll T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol* 2008, 83(3):536-45.
3. FAO/WHO: Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report 2001, Available from www.fao.org/es/ESN/probio/probio.htm.
4. Cross ML. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002, 34(4):245-53.
5. Gill HS, Rutherford KJ, Prasad J, Gopal PK. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Br J Nutr* 2000, 83(2):167-76.
6. Perdigón G, Maldonado Galdeano C, Valdez JC, Medici M. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *Eur J Clin Nutr* 2002, 56(Suppl 4):21-6.
7. Ménard S, Candalh C, Bambou JC, Terpend K, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. *Gut* 2004, 53(6):821-8.
8. Villena J, Racedo S, Agüero G, Bru E, Medina M, Alvarez S. *Lactobacillus casei* improves resistance to pneumococcal respiratory infection in malnourished mice. *J Nutr* 2005, 135(6):1462-9.
9. Salva S, Villena J, Racedo S, Alvarez S, Agüero G. *Lactobacillus casei* addition to a repletion diet-induced early normalisation of cytokine profiles during a pneumococcal infection in malnourished mice. *Food Agr Immunol* 2008, 19(3):195-211.
10. Agüero G, Villena J, Racedo S, Haro C, Alvarez S. Beneficial immunomodulatory activity of *Lactobacillus casei* in malnourished mice pneumonia: effect on inflammation and coagulation. *Nutrition* 2006, 22(7-8):810-9.
11. Medina M, Izquierdo E, Ennahar S, Sanz Y. Differential immunomodulatory properties of *Bifidobacterium logum* strains: relevance to probiotic selection and clinical applications. *Clinical & Experimental Immunology* 2007; 150:531-538.

12. Shida K, Kiyoshima-Shibata J, Nagaoka M, Watanabe K, Nanno M. Induction of Interleukin-12 by *Lactobacillus* Strains Having a Rigid Cell Wall Resistant to Intracellular Digestion. *Journal of dairy science* 2006; 89:3306-3317.
13. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:353-64.
14. Galdeano CM, de Moreno de LeBlanc A, Vinderola G, Bonet ME, Perdigon G. Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14:485-492.
15. Racedo S, Villena J, Medina M, Aguero G, Rodriguez V, Alvarez S. *Lactobacillus casei* administration reduces lung injuries in a *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Microbes Infect* 2006; 8:2359-66.
16. Ling PR, Smith RJ, Kie S, Boyce P, Bistrian BR. Effects of protein malnutrition on IL-6-mediated signaling in the liver and the systemic acute-phase response in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287:R801-808.



BASES MOLECULARES DE FENOTIPOS INUSUALES DE RESISTENCIA EN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Sonia Arduino, Jorgelina Smayevsky, Dolores García.

Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas "Norberto Quirno" CEMIC

INTRODUCCIÓN

P. aeruginosa posee bajos requerimientos nutricionales y una gran ubicuidad y puede persistir en desinfectantes, jabones, equipos de terapia respiratoria, nebulizadores, soluciones de lente de contacto, piletas, suelos, etc. Estas características y su gran variedad de factores de patogenicidad, la convierten en un importante agente causal de infecciones asociadas al ámbito hospitalario y de la comunidad. *P. aeruginosa* ha sido identificada como agente causal de infecciones respiratorias en pacientes fibroquísticos, infección urinaria, infección de sitio quirúrgico, bacteriemias, infecciones oculares, otitis y sinusitis y es una de las principales causa de neumonía asociada a ventilación mecánica, que se caracteriza por una alta morbi-mortalidad con incremento de la estadía y costos hospitalarios. Una de las principales complicaciones en el tratamiento de las infecciones causadas por *P. aeruginosa* es su alta resistencia intrínseca a distintos grupos de antibióticos y su gran capacidad de desarrollar y/o adquirir nuevos mecanismos de resistencia. De esta manera se ha ido incrementando la frecuencia de aparición de cepas multirresistentes y disminuyendo notablemente las opciones terapéuticas (1, 2).

La resistencia a IPM en *P. aeruginosa* se puede desarrollar por varios mecanismos que incluyen las alteraciones en la porina de membrana externa OprD que facilita la entrada través de la membrana externa de pequeños péptidos, aminoácidos básicos, y de su análogo estructural: IPM (3), la sobre-expresión de la β -lactamasa cromosomal AMPC, la adquisición de carba-penemasas y/o metallo- β -lactamasas, y las alteraciones en algunos de los sistemas de eflujo (4,5). El sistema de eflujo MexEF-OprN, que habitualmente no se encuentra expresado en las cepas salvajes, puede ser expresado debido a la alteración en el regulador positivo *mexT*, según lo observado en las mutantes *nfxC*. Estas mutantes tienen resistencia a quinolonas fluoradas,

chloranphenicol, trimethoprima y al carbapenem IPM. La resistencia de IPM en este tipo de mutantes es debida a la disminución de OprD que ocurre concomitante a la expresión de la bomba de eflujo de MexEF-OprN (5).

Los carbapenemes constituyen una opción terapéutica importante, debido a su mayor actividad frente a bacterias con distintos mecanismos de resistencia y pueden ser utilizados en infecciones graves por estos microorganismos, pero en los últimos años se ha observado a nivel mundial un incremento en la resistencia a los mismos.

En nuestro hospital, se ha observado en los últimos años un aumento sostenido de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente que en la actualidad representa la segunda bacteria de mayor incidencia de infecciones intrahospitalarias solo precedido por *Acinetobacter baumannii*. Además, se ha observado un aumento de resistencia a los carbapenemes en *P. aeruginosa* que ha sido constante y ha alcanzado niveles alarmantes en los últimos años. En un estudio previo sobre 654 aislamientos de *P. aeruginosa* durante el periodo 2005-2008, se observó que un 15,8% presentó solamente resistencia a carbapenemes. La resistencia a los carbapenemes fue superior a la de los otros b-lactámicos, siendo el fenotipo de resistencia más frecuente en nuestra institución. Además, un 4% presentó otro fenotipo poco común, sensibilidad a ceftazidima (CAZ) y resistencia a cefepime (FEP) (6,7). Esto ha sido descrito como causa ya sea de la desregulación del sistema de eflujo MexXYOprM o la presencia de b-lactamasas del tipo OXA (8,9).

Se estudiaron aislamientos de *P. aeruginosa* multiresistentes provenientes de la colección bacteriana de nuestro laboratorio de Microbiología con el objetivo de determinar las bases moleculares que llevan a alta resistencia a Imipenem y el fenotipo inusual CAZ S/ FEP R observado en algunos aislamientos.

MATERIALES Y METODOS

Aislamientos bacteriano: Se utilizaron para este estudio aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* multiresistentes clínicamente significativos de infección provenientes de pacientes hospitalizados en la institución y obtenidos durante el año 2008 y 2009.

Estudios de sensibilidad: Los estudios de sensibilidad a los antibióticos se realizaron por el método de difusión con discos según las recomendaciones de CLSI (10), para Piperacilina-tazobactam, ceftazidima, cefepime, imipenem, meropenem, por el método de dilución en agar según recomen-

daciones de CLSI (11) para imipenem y meropenem. Para determinar la presencia de hiperexpresión de la β -lactamasa cromosómica AMPC y metalo- β -lactamasas se realizaron test de inhibición en Mueller-Hinton agar utilizando discos de ácido borónico y EDTA respectivamente según lo recomendado por la División Antimicrobianos del Instituto Malbran (Protocolo de trabajo Red WONET 2009) y Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) M100-S19. 2009.

Estudio de genes de resistencia por la técnica de PCR.

Se estudiaron los genes *oprD*, *ampC*, *bla*^{KPC} y sus secuencias adyacentes. En aislamientos donde no se obtuvieron amplicones, tanto para *oprD*, como para *ampC*, se usaron oligos diseñados para amplificar regiones de mayor tamaño, y así poder detectar deleciones largas. Se analizaron las secuencias de los genes reguladores de bombas de eflujo MexXY OprM y MexEF OprN. Estudiamos la presencia y contenido de integrones de clase 1 para detectar posibles mecanismos que puedan dar origen a los fenotipos observados. Los oligos utilizados en este estudio están descriptos en Tabla 1.

Secuenciación y análisis de secuencias

La secuenciación de los amplicones obtenidos fue realizada en laboratorio externo

Para el **análisis de las secuencias nucleotídicas de los amplicones obtenidos se utilizó software disponible en** <http://www.washington.edu> y <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. El análisis de las correspondientes secuencias aminoácídicas se realizó con programas <http://au.expasy.org/tools>.

RESULTADOS

Estudios de sensibilidad y detección de β -lactamasas

De los 110 aislamientos de *P. aeruginosa* estudiados, 56 presentaron multiresistencia. De estos 56 aislamientos multiresistentes, 25 (45%) presentaron sensibilidad disminuida o resistencia a imipenem, y 9 aislamientos además presentaron resistencia a meropenem. Los resultados se muestran en tabla 2. Se encontraron 3 aislamientos que presentaron resistencia a FEP y sensibilidad a CAZ, un fenotipo inusual ya que FEP es una cefalosporina de cuarta generación con mayor cobertura para bacilos gram negativos. No se encontraron metalo- β -lactamasas en el grupo de aislamientos estudiados.

Estudio de las proteína de membrana externa OprD

Se estudio la proteína OprD en 8 aislamientos que presentaron resistencia moderada o alta a imipenem CIM ($> = 8$ mg/l), sensibilidad a a Mero-penem (CIM ≤ 4 mg/l), ceftacidima (CIM ≤ 8 mg/l) y a las combinaciones de betalactamicos con inhibidores de betalactamasa: piperacilina-tazobactama (CIM $\leq 64/4$) (CLSI 2010). Si bien en 4 aislamientos se obtuvieron bandas del tamaño esperado (aprox.1300 pb), en 2 aislamientos, el análisis de las secuencias revelo la presencia de deleciones de 1 o 2 pb en la secuencias nucleotidicas del gen estructural que llevan a la presencia de codones stop prematuros en la secuencia aminoacidica. Como consecuencia se traducen proteínas considerablemente más cortas comparadas con la cepa control PAO1. En 1 aislamiento, la secuencia nucleotidica del gen *oprD* mostro varias deleciones cortas de 1-3 pb y varias mutaciones. Se analizaron los cromatogramas de las secuencias en forward y en reverse para confirmar las deleciones y mutaciones observadas. Si bien en la proteína no se observaron codones stop prematuros, se observaron mutaciones en los aminoácidos en tres regiones. Es importante la alteración observada en la región de loop 3 de la proteína ya que esta región tiene un rol importante en el pasaje de IMP por la porina (12). La proteína traducida solo comparte un **91%** de identidad con la proteína control de PAO1.

En 3 aislamientos, no se obtuvieron amplicones con ninguno de los pares de oligos utilizados, ya sea los que reconocen regiones internas del gen *oprD* así como los que reconocen regiones externas al mismo. Los

experimentos se realizaron por duplicado para cada aislamiento, usando como control *P. aeruginosa* ATCC # 27853, y los resultados fueron siempre negativos. En estos aislamientos es posible que haya una deleción de una región del cromosoma que incluye el gen de *oprD* así como sus regiones adyacentes.

Finalmente en 1 aislamiento se obtuvo un amplicon de menor tamaño, y el análisis de su secuencia revelo la presencia de solo 550 pb del gen *oprD*, al que le faltan regiones fundamentales para su expresión y funcionamiento (12).

Estudio del sistema de eflujo MEX EF OprN

Se estudiaron las secuencias de dos reguladores *mexT* y PA2491(*mexS*) del sistema de eflujo MEX EF OprN, en dos aislamientos: uno que no presento alteraciones en la secuencia de OprD, y otro con deleciones cortas en la secuencia de OprD. El gen *mexT* no presento alteraciones en su secuencia en ambos aislamientos pero el gen *mexS* mostro en un aislamiento un codón

stop prematuro. En la tabla 3 se muestran los aislamientos que presentaron resistencia a Imipenem y sensibilidad a cefalosporinas de tercera generación y combinaciones con inhibidores, con los genes analizados.

Evaluación de la contribución de la sobreexpresión de *AMP*C a la resistencia observada a imipenem.

Se seleccionaron 8 aislamientos que además de la resistencia a imipenem, mostraban resistencia a las cefalosporinas de tercera generación como ceftacidima (CIM >8mg/l) y a piperacilina-tazobactama (CIM>64/4) (CLSI 2010) a los que se les realizaron estudios genotípicos y fenotípicos.

Estudios fenotípicos de inhibición por ácido borónico

Para detectar la eventual presencia de enzimas que confieren resistencia a carbapenemes, se realizaron estudios fenotípicos de inhibición con ácido borónico, que es inhibidor de enzimas de tipo ampC y KPC .

Se utilizaron discos de ácido borónico, en combinación con imipenem y meropenem (según CLSI, Instituto Malbran), y se observó que en presencia del mismo, los halos de inhibición de los carbapenemes se agrandaba. Esto significaba la presencia de alguno de los siguientes mecanismos contribuyendo a la resistencia a los carbapenemes: sobreexpresión de *ampC*, presencia de enzimas de tipo KPC o ambos mecanismos.

Debido a ello se realizó PCR con oligos específicos para detectar la presencia de carbapenemasas de tipo KPC, y los resultados fueron negativos en este grupo de aislamientos.

Estudio del gen *ampD*: regulador negativo de la expresión de *ampC*

Se investigó la presencia de alteraciones en el gen *ampD*, un regulador negativo para la expresión de *ampC*, la beta lactamasa cromosomal de *Pseudomonas aeruginosa* y/o la proteína de fusión AmpD/AmpE, proteína de transmembrana. En 2 aislamientos se obtuvieron amplicones del tamaño esperado para *ampD* (1000 pb) en tanto en 6 no se obtuvieron amplicones. La secuencia de estos amplicones reveló la presencia de mutaciones en la secuencia nucleotídica, que se tradujo en mutaciones en la secuencia aminoácida de la proteína.

En 6 aislamientos, en los que no se obtuvieron amplicones con esos oligos, se realizó PCR con un segundo par de oligos que reconocen regiones externas de *ampD*, y se obtuvieron amplicones de menor tamaño en 3 aislamientos. El análisis de las secuencias reveló la presencia de deleciones

largas en el gen *ampD* que llevan a la no expresión de la proteína. En 3 aislamientos, no se obtuvieron amplicones, con ninguno de los pares de oligos usados. Los experimentos se realizaron por duplicado, usando como control positivo *P. aeruginosa*

ATCC # 27853. Esto implicaría delecciones grandes que incluyen el gen *ampD* así como sus regiones adyacentes.

En dos aislamientos, se estudio además, el gen *OprD*. El análisis de secuencias de los amplicones mostro la presencia de mutaciones que llevan en ambos casos a la presencia de codones stop muy prematuros en la síntesis de proteína, que implican falta de proteína OprD funcional en estos aislamientos.

Estudio del fenotipo inusual de resistencia CEF-R / CAZ-S

Se analizaron la secuencias de los amplicones obtenidos con oligos que reconocen secuencias de los segmentos conservados 3 CS y 5 C en los 3 aislamientos con resistencia a FEP y sensibilidad a CAZ, un fenotipo inusual. En dos de los aislamientos se encontró presencia de integrones de Clase 1, con diferentes arreglos de cassettes (*aadA6*- *orfD*, *aac6* *lb*, *aacA4*- *orfD*) no se detecto la presencia de enzimas de tipo OXA en estos aislamientos. En el tercer aislamiento, del que se secuencio un amplicon de 3000 pb se encontró un arreglo de cassettes diferente conteniendo una b-lactamasa de tipo OXA (*aadB-catBparcial-bla*^{OXA129}-*dfrA5-aacA4* proteína de fusión).

Se estudio en los mismos aislamientos el regulador *mexZ* de la bomba de eflujo MexXY OprM. El análisis de las secuencias revelo que dichos genes no mostraban alteraciones tanto en su secuencia nucleotidica como en sus proteínas. Además estos aislamientos presentaron sensibilidad a aminoglicosidos y a ciprofloxacina, antibióticos que también son excluidos por este sistema. Todos estos resultados indican que en los aislamientos con este perfil de resistencia, la contribución de la bomba de eflujo MexXY OprM seria escasa.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Encontramos diversos mecanismos que contribuyen a la resistencia de imipenem en los aislamientos estudiados, entre los que se destacan las alteraciones en la proteína de membrana OprD y la sobreexpression de la beta-lactamasa cromosomal AmpC.

En los 8 aislamientos que mostraron solo resistencia a imipenem, la proteína de membrana OprD estaba alterada o ausente indicando que es el principal mecanismo de resistencia. Por otro lado estos aislamientos mostraron sensibilidad a meropenem, antibiótico que usa una vía alternativa para ingresar a la célula bacteriana. En un aislamiento de este grupo, se encontró alterado el gen *mexS*, lo que puede llevar a la expresión del sistema MexEF OprN con disminución de expresión de OprD, aunque el gen *oprD* no tenga alteraciones en su secuencia (13). Esto trae como consecuencia un aumento de la CIM de imipenem y además se observa resistencia a quinolonas fluoradas como ciprofloxacina, drogas excluidas por este sistema.

En el grupo de aislamiento que además de la resistencia a imipenem mostraban resistencia a cefalosporinas y combinación con inhibidores, los estudios fenotípicos indicaban sobreexpresión de enzimas AmpC cromosomal o presencia de KPC. La resistencia a carbapenemes debido a la producción de enzimas de tipo KPC ha sido demostrada en nuestra institución desde fines de 2009. La plataforma genética conteniendo este mecanismo de resistencia, ya ha sido caracterizada en nuestro laboratorio, y corresponde a la ya descrita por Rice y col. (14). Esta región genética, se encuentra en un transposon, y es altamente transferible, lo que explica la velocidad con que se ha transmitido entre *Enterobacteriaceae* en nuestra institución.

En los últimos meses de este estudio, se encontró este mecanismo, localizado en la misma región genética en 2 aislamientos de *P. aeruginosa* de pacientes hospitalizados en nuestra institución. Los estudios para detectar la presencia de carbapenemasas de tipo KPC en los aislamientos incluidos en este estudio fueron negativos. Esto indica que en los aislamientos incluidos en este estudio, los perfiles de resistencia observados se deben a sobreexpresión de AMPC. Mediante el estudio del gen *ampD*, regulador negativo de *ampC*, en estos aislamientos, se determinó que este gen regulador estaba alterado o ausente. Estos resultados demuestran que la sobreexpresión de AMPC es un mecanismo que contribuye en gran medida al fenotipo de resistencia de los aislamientos de este estudio. Además, en algunos aislamientos, la proteína de membrana OprD se encontró alterada. Estos resultados muestran que hay una sumatoria de mecanismos de resistencia que explican los fenotipos observados en los aislamientos estudiados.

El análisis de los arreglos de cassettes en la región variable de integrones de clase 1 estudiados en aislamientos con el fenotipo de resistencia FEP-R/CAZ-S mostró la presencia de una betalactamasa de tipo OXA en un aislamiento que podría ser responsable de ese fenotipo.

La investigación de las bases moleculares de los mecanismos de resistencia así como su entorno genético, permite limitar la diseminación de aislamientos y los mecanismos de resistencia implementando y/o modificando las medidas destinadas al control de infecciones en forma temprana. Debido a la constante evolución de los genomas, cuando se analizan genes como *OprD* en *P. aeruginosa*, se observa una gran diversidad de mutaciones tanto en aislamientos ambientales como clínicos. Los resultados obtenidos en este estudio, utilizando aislamientos clínicos, muestran que los fenotipos de resistencia observados en aislamientos de *P. aeruginosa* se deben a la presencia de más de un mecanismo de resistencias en la mayoría de los casos.

Las infecciones intrahospitalarias con bacterias multiresistentes, además de constituir un riesgo para la vida del paciente, elevan considerablemente los costos de atención, y prolongan los días camas de internación, por lo tanto la investigación de sus causas a nivel molecular, que posibilite adecuadas y rápidas intervenciones para su prevención, es esencial para aumentar la calidad de atención de un centro hospitalario

RESUMEN

P. aeruginosa es un importante patógeno de infecciones hospitalarias, las cuales se caracterizan por una alta morbi-mortalidad con incremento de los costos.

En nuestro hospital, se ha observado un aumento sostenido de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* y un aumento de resistencia a los carbapenemes en esta especie que ha alcanzado niveles alarmantes en los últimos años. En un estudio previo, se observó que la resistencia a los carbapenemes fue superior a la de los otros b-lactámicos, siendo el fenotipo de resistencia más frecuente en nuestra institución. Además, 3 aislamientos presentaron un fenotipo poco común, sensibilidad a ceftazidima y resistencia a cefepime. Se estudiaron aislamientos de *P. aeruginosa* multiresistentes obtenidos durante el periodo 2008-2009, con el objetivo de determinar las bases moleculares que llevan a alta resistencia a Imipenem.

Encontramos diversos mecanismos que contribuyen a la resistencia de IPM en los aislamientos estudiados, entre los que se destacan las alteraciones en la proteína de membrana OprD y la sobreexpresión de la betalactamasa cromosomal AmpC.

Si bien en nuestro hospital a fines del 2009, hubo un brote de infección hospitalaria por enterobacterias portadoras de carbapenemasas de tipo KPC, y dicho mecanismo también fue caracterizado en aislamientos de *P.*

aeruginosa, no se detectaron estas betalactamasas en los aislamientos de este estudio, así como tampoco se detectaron metalo betalactamasas en el grupo de aislamientos estudiados. Solo en un aislamiento que presento fenotipo inusual cefepime R ceftacidima S, se detecto la presencia de una betalactamasa de tipo OXA localizada en un integron junto con otros genes de resistencia. Los fenotipos de resistencia al imipenem observados en los aislamientos utilizados para este estudio son debido a la presencia de uno o más mecanismos cromosomales, fundamentalmente a alteraciones en la proteína de membrana OprD, a lo que se agrega la sobreexpresión de la beta lactamasa AMPC en algunos aislamientos.

En *P. aeruginosa*, es sumamente importante saber si la resistencia a carbapenemes es debido a mecanismos cromosomales, o a enzimas que pueden estar localizadas en elementos altamente transferibles, para establecer conductas a tomar con el fin de evitar los brotes intrahospitalarios.

SUMMARY

P. aeruginosa is an important pathogen of nosocomial infections, characterized by high morbidity and mortality with increased costs. In our hospital, there has been a steady increase in infections by *P. aeruginosa* and increased carbapenem resistance in this species that has reached alarming levels in recent years. In a previous study it was observed that carbapenemes resistance was superior to the other b-lactams, being the most common resistance phenotype in our institution. In addition, 3 isolates presented a rare phenotype, sensitivity to ceftazidime and resistance to cefepime. We studied isolates of *P. aeruginosa* multiresistant obtained during the period 2008-2009, aiming to determine the molecular basis leading to high resistance to imipenem. We found several mechanisms that contribute to IPM resistance in the studied isolates, including alterations in membrane protein OprD and overexpression chromosomal AmpC-lactamase. In late 2009, there was an outbreak of hospital infection by *enterobacteriaceae* carrying carbapenemase KPC-type, in our institution. Although, this mechanism was also characterized in isolates of *P. aeruginosa*, these beta-lactamases were not detected in the isolates used in this study, nor metallo beta-lactamases were detected in the group of studied isolates. In one isolate that presented unusual phenotype ceftazidime S cefepime R, was detected the presence of an OXA-type beta-lactamase located in an integron with other resistance genes. The imipenem resistance phenotypes observed in the isolates used for this study are due to the presence of one or more chromosomal mechanisms, primarily changes in

membrane protein OprD, which is added to the overexpression of the beta lactamase AMPC in some isolates. In *P. aeruginosa*, it is extremely important to know whether carbapenem resistance is due to chromosomal mechanisms, or enzymes that can be located in highly transferable elements for establishing conduct to take in order to prevent nosocomial outbreaks.

REFERENCIAS

1. Lister P., Wolter D. y Hanson N. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews* (2009). 22:582–610.
2. Nicolau C.J. y Oliver A. Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (2010). 28(Supl 1):19-28.
3. **Huang, H., and R. E. W. Hancock.** 1993. Genetic definition of the substrate selectivity of outer membrane protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 175:7793-7800.
4. Arduino S.M. Molecular mechanisms causing Imipenem resistance among *P. aeruginosa* isolates from Intensive care Units (ICU) patients. 2006. Annual Conference on Antimicrobial Resistance. National Foundation for Infectious Diseases. Bethesda. MD.2006.
5. Poole K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004; 10:12-26.
6. García Ramírez D., Nicola F., Arduino S., Relloso S., Smayevsky J. Fenotipos de resistencia a b-lactámicos en aislamientos de *P. aeruginosa* de pacientes internados. J. IX Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología (SADI), Mar del Plata, Argentina, 2009.
7. Nicola F., García Ramírez D., Arduino S., Di Chiara M. Y Smayevsky J. Actividad in vitro comparativa de Doripenem y otros carbapenemes frente a *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Argentina de Microbiología. RAM.* 2010.
8. Aubert D., L. Poirel, J. Chevalier, S Leotard, J-M Pages and P. Nordmann. 2001. Oxacillinase-Mediated Resistance to Cefepime and Susceptibility to Ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1615-20.
9. Hocquet D., P. Nordmann, F. El Garch, L. Cabanne and P. Plesiat. 2006.

- Involvement of the MexXY-OprM Efflux System in Emergence of Cefepime Resistance in Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 50: 1347–1351.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standards, 10th ed., 2009; M02-A10. Wayne, Pa, USA.
 11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; 8th ed., 2008; M07-A8. Wayne, Pa, USA.
 12. Ochs M., R.W.Hancock. 2000. Role of Putative Loops 2 and 3 in Imipenem Passage through the Specific Porin OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 44: 1983–1985.
 13. Sobel, M. L., S. Neshat, and K. Poole. 2005. Mutations in PA2491 (mexS) promote MexT-dependent mexEF-oprN expression and multidrug resistance in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 187:1246-1253.
 14. Rice L., Carias L., Hutton R., Rudin S., Endimiani A., Y Bonomo R. The KQ Element, a Complex Genetic Region Conferring Transferable Resistance to Carbapenems, Aminoglycosides, and Fluoroquinolones in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2008); 12: 3427–3429.

Tabla 1. Oligos usados en este estudio

OLIGO	SECUENCIA (5'-3')
OprD 1	CGA CCT GCT GCT CCG CAA CTA
OprD2	CGC CGT AGC CGT AGT TCT TAT
OprD3	GTC GGC GGG GGT TTC TTT GAG C
OprD4	GTC ACT GCG GCA CTG TGA TGG C
AmpD1	GCT GCG TGT CGG AGT TGG GTG GAG ATC CAG
AmpDE1	GTCACCTCCGGCGTTATCGAGC
AmpDE2	GATGCTGCTGATCTGCCTCAAG
AmpD2	GAG GGC AGA TCC TCG ACC AGG CTC AGC CAG
KPC-R	CGTTGTCATCCTTGTTAG
KPC-F	CCGTCTAGTTCTGCTGTC
5'CS	GGCATCCAAGCAGCAAG
3'CS	AAGCAGACTTGACCTGA

MexZ1	CCA GCA GGA ATA GGC CGA CCA GGG C
MexZ2	CAG CGT GGA GAT CGA AGG CAG CCG G
MexTF	CTC GGG ACA TCG CAA ACC TC
MexTR	TGG AAT AAG CCG CAC ACC C
MexSF	GGG CCC CGG CGA GAT GTA TG
MexSR	GCA TAG GAT CAC TGA CAG GC

Tabla 2: Resultados de los estudios de concentración inhibitoria mínima (CIM) (56 aislamientos)

ANTIBIOTICOS (mg/L)

	PT	CAZ	CEF	AZT	IMI	MERO
RANGO CIM	≤ 4 - 128	≤ 0.5- 64	≤ 0.5- 64	32-1	≤ 0.5- 16	≤ 0.5- 8
CIM 90	64	16	16	16	8	8

Tabla 3. Aislamientos que presentaron resistencia a Imipenem y sensibilidad a cefalosporinas y combinaciones con inhibidores, con los genes analizados

#	PCR OprD	OPRD	mexT	mex S	PT CIM	CAZ CIM	CEF CIM	IMI CIM	MERO CIM
2	1000pb	mut en loop 3			≤ 4	1	1	8	2
6	1000pb	sin cambio	sin cambio	codon stop	4	2	4	8	4
17		negativo			32	8	4	8	4
19	1000pb	del corta 1-3 pb – codón stop nt	sin cambio	sin cambio	≤ 4	2	2	8	4
28		negativo			16	2	2	16	4
30	400-600 pb	delecion larga			≤ 4	1	2	8	4
33	negativo	negativo			8	4	8	16	4
46	1000pb	codon stop nt713			≤ 4	≤ 0.5	2	8	1

ESTUDIO DE LOS CAMBIOS FENOTÍPICOS EN CÉLULAS STELLATE HEPÁTICAS DE RATA ADULTA *IN VITRO*, ASOCIADOS AL MICROAMBIENTE

Andrea Valeria Arnejo, Alejandra Hidalgo, Anselmo Adrian Bologna y
Mariana Barbich
Instituto de Ciencias Básica y Medicina Experimental (ICBME) Hospital Italiano
de Buenos Aires,

SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS DEL PROYECTO

Las células stellate hepática constituyen una población con características y propiedades esenciales en el mantenimiento de la homeostasis hepática.

La fibrosis hepática es un proceso dinámico y regulado que se desencadena en respuesta a la lesión hepatocelular crónica provocada por diversas causas. La fuente principal de ese tejido fibroso son las células stellate hepáticas. En condiciones fisiológicas, las HSCs quiescentes desempeñan un papel fundamental al regular la homeostasis de los retinoides y la remodelación de la matriz extracelular (MEC) tanto por medio de su capacidad de sintetizar los componentes de ésta, como por su capacidad para producir diferentes metaloproteinasas degradantes de la MEC y sus inhibidores. Sin embargo, durante la fibrogénesis hepática, las HSC se activan diferenciándose en células parecidas a los miofibroblastos con capacidad proliferativa, fibrogénica y contráctil para desempeñar un papel primordial en la configuración de la fibrosis hepática y en el control del flujo sanguíneo del hígado (**M. Sarem/ Gastroenterol Hepatol. 2006;(2):93-101**)

En este trabajo conseguimos aislar células stellate hepáticas de rata adulta, a partir de hígados de rata wistar macho normales sin inducción previa de daño hepático. Las células obtenidas por el método de enriquecimiento, pudieron ser cultivadas a largo plazo (ocho semanas), sin tratamientos enzimáticos ni cambios de superficie de adhesión,

Los estímulos mitóticos fueron aportados por los factores presentes en el suero fetal bovino, pero no hubo “pasajes”, que favorecieran la proliferación celular como consecuencia de la acción de la tripsina y el aumento de la superficie de cultivo. En ausencia de ambos estímulos es que se observó la

evolución de las células. Esta modalidad de cultivo in vitro se diferencia de las metodologías con las que se mantiene una línea celular.

De esta manera, y partiendo de células derivadas de un animal normal, definimos un modelo de cultivo in vitro estático, a pesar de lo cual, pudimos observar cambios en las poblaciones celulares que lo integran

Los resultados obtenidos en cuanto al rendimiento de las HSCs fueron en promedio de **6.52 x 10⁶ células/gramo de tejido**. El cual está dentro del rango esperado según la bibliografía donde las células stellate hepáticas (HSCs) representan entre 5 - 8 % del total de las células hepáticas en un hígado normal (**A. Geerts/ Journal of Hepatology 40 (2004)**).

Es sabido que las células stellate hepáticas, en su estado quiescente se caracterizan por presentar en su citoplasma múltiples y prominentes “gotas” de lípidos, los cuales representan el principal almacenamiento de vitamina A (retinol). Más del 90% de la vitamina A hepática se halla almacenada en las HSCs, mientras que el resto se encuentra en las células parenquimatosas (**M. Sarem/ Gastroenterol Hepatol. 2006;(2):93-101**)

Para visualizar las vesículas intracitoplasmáticas que contienen vitamina A (droplets) presentes en las HSCs, se utilizó la tinción de Oil Red-O. Esta tinción, es utilizada para teñir los lípidos que se encuentran en las células (**Lillie RD. Arch Pathol 1943**). En el caso de las HSCs la tinción de Oil-Red O tiñe las vesículas intracitoplasmáticas de vitamina A que se encuentran en la zona perinuclear de las HSCs quiescentes, concretamente tiñe los ácidos grasos que se esterifican con el retinol (**Hendriks HFJ. Exper Cell Res, 1985**)

Nosotros pudimos observar, 24 horas post siembra en células de aspecto fibroblastoides el mayor pico de gotas lipídicas (en citoplasma, zona perinuclear y prolongaciones). A medida que transcurrieron las semanas estas gotas fueron disminuyendo hasta casi ser indetectables al final del periodo en estudio.

La α -SMA está presente en todos los tipos de células, pero se encuentra específicamente en las células musculares (**Jasani B, Schmid KW. 1993**). En el caso de las HSCs la presencia de este marcador marca la aparición de un proceso de activación de las células (**Ramadori G. Virchows Arch B Cell Pathol 1990**)

Tras la lesión crónica del tejido hepático, cualquiera sea su etiología, las HSCs sufren un proceso denominado “activación”. Este proceso se caracteriza por la pérdida de las típicas gotas lipídicas, aumento de la expresión de proteínas, el aumento del número y tamaño celular y la transdiferenciación fenotípica a células proliferativas, fibrogénicas y contráctiles que la asemejan

a miofibroblastos. La aparición de α -SMA entre otras modificaciones son evidencias que sostienen lo anterior. Estas modificaciones se observan sólo en las HSCs activadas, no en las quiescentes

En nuestros cultivos a largo plazo la expresión de α -SMA se da a partir de los 7 días de cultivo, y es mantenida durante todo el periodo de estudio, con fluctuaciones que tienden al aumento de células HSCs α -SMA positivas.

El cultivo primario a largo plazo pone en evidencia cambios en la expresión de marcadores a lo largo del tiempo, los cuales podrían indicar variaciones en el grado de activación celular: por pérdida de gotas lipídicas y la expresión de α -SMA. Si bien nuestra modalidad de cultivo es distinta a la habitual, la activación de las HSCs in-vitro es comparable con la que describen otros autores. **(Alena Jiroutová y col/ Acta Medica (Hradec Králové) 2005;48 (3-4):137-144)**

Sabemos que la consecuencia final de la activación es la modificación en la composición de la matriz extracelular hepática, la cual conduce a la fibrosis y en casos crónicos a la cirrosis hepática.

Actualmente hay consenso en que la activación de las HSCs es el eje central de la fibrogenesis hepática, y además de su capacidad para producir fibrosis, estas células también se comportan como células presentadores de antígenos (APC) y podrían ser células progenitoras capaces de diferenciarse en células endoteliales y en hepatocitos, lo cual destaca su gran funcionalidad y su importante papel en la regeneración del hígado y en la génesis de los procesos patológicos **(Gressner OA. Weiskirchen R, Gressner AM. Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options. Comparative Hepatology 2007; 6: 1-13.)**

La nestina fue descrita originalmente como un marcador de células madre en cerebro. Es una proteína de filamento intermedio de clase VI que se encuentra intracelularmente en muchos tejidos como músculo cardíaco, hígado y médula ósea y se ha visto que regula la expresión de células diferenciadas en estos tejidos. Este marcador es expresado transitoriamente en diferentes tipos celulares del tejido embrionario y del tejido adulto, jugando un papel trascendental en la proliferación y migración de las células progenitoras. Las células nestina positivas se caracterizan por tener una plasticidad elevada. Bajo condiciones patológicas, se expresa durante procesos de reparación en hígado, músculo, sistema nervioso central y miocardio infartado, y también esta presente en ciertos tumores agresivos. No obstante su rol en las células cancerosas aun no se ha establecido. **(Ishiwata T, 2011)**

En cuanto a los cultivos primarios de HSCs, la expresión de Nestina se evidencia a partir de las 24 horas de cultivo y se mantiene a lo largo de todo el periodo estudiado.

El CD133 originalmente llamado AC133, también conocida en humanos y roedores como Prominin-1 (Prom-1), es una glicoproteína transmembrana (5- TM) que localiza específicamente a las prominencias o salientes celulares **(D Mizrak, J Pathol 2008)**

Es sabido que CD 133 se expresa en células progenitoras endoteliales, stem cells hematopoyéticas, glioblastomas, células madre de la glia y neuronal y otros tipos celulares. **(Kordes C, Hepatology 2007),**

Asimismo, se ha demostrado que las HSCs cultivadas in vitro, expresan marcadores de células progenitoras y muestran la capacidad de convertirse en tipo-miofibroblastos, tipo-endotelial y tipo-hepatocitario. **(Kordes C, Hepatology 2007)** El potencial de diferenciarse en linajes endoteliales o hepatocitario sugiere importantes funciones de HSCs CD133+ durante la regeneración hepática,

Además de ser un marcador de regeneración, esta molécula se ha encontrado presente en carcinomas hepatocelulares, y su presencia esta asociada a un mal pronostico de la enfermedad. **(Sasaki A, Oncology Res, 2010)**

En nuestros cultivos primarios de HSCs, la expresión de CD 133 se evidencia a partir de las 24 horas de cultivo y se mantiene a lo largo de todo el periodo estudiado.

Nestina y CD 133 se expresan tanto en células con capacidad regenerativa, como en algunos tumores, ambos marcadores se expresan en las células en cultivo a partir de las 24 hora del cultivo y a lo largo de todo el periodo en estudio.

Si consideramos que nuestro modelo in vitro reproduce la evolución de la fibrosis hepática, en términos de activación de las células stellate, y que en este proceso, hay cambios que conducen a la cirrosis con la aparición de focos regenerativos, y en algunos casos a la aparición de un hepatocarcinoma, estos marcadores podrían ser considerados como indicadores de esta situación.

La vimentina, es un filamento intermedio de clase III, que se encuentra principalmente en células de origen mesenquimático (fibroblastos, condrocitos, adipocitos), también aparecen en algunas células mesodérmicas (melanocitos, células gliares, células epiteliales). La vimentina es un marcador básico para células stellate hepáticas.

En nuestro caso y por problemas de técnica, no pudimos evaluarlo fehacientemente en nuestros cultivos

Además de las células HSC en diferentes porcentajes, Los cultivos mostraron la presencia de distintas poblaciones celulares. Encontramos dos tipos celulares mas: una de ellas formadas por células con morfología de tipo hepatocito,¹ y una tercer población que expresaba: CD133, nestina, pero no expresaban Oil Red-O, ni alfa-SMA. La visualización de ésta población fue a partir de las 2 semanas de cultivo y se mantuvo presente hasta el final del periodo en estudio, pero no pudimos caracterizarla fehacientemente.

En cuanto a los cultivos tratados con factores de crecimiento, si bien se observaron cambios morfológicos, fundamentalmente asociado al tamaño de las prolongaciones de las células con respecto al grupo control, necesitamos profundizar su estudio para poder evaluarlos correctamente

CONCLUSIÓN

Teniendo en cuenta estas características y nuestros resultados in vitro, podemos afirmar que este modelo de cultivo primario a largo plazo, se asemeja a un hígado fibrótico, debido a las células y marcadores que se expresan, y justifica profundizar en el estudio de las células y su evolución. Las células stellate hepáticas juegan un papel funcional importante en distintos procesos fisiopatológicos, incluyendo la fibrosis hepática, por tal motivo, el conocimiento de sus características en un futuro nos podría permitir modular su fenotipo y de esta manera utilizar estas células como posibles blancos terapéuticos ante situaciones de daño.

ABSTRACT

Hepatic stellate cells constitute a population with characteristics and properties that are essential to the maintenance of liver homeostasis. During hepatic fibrogenesis, these cells are activated and they differentiate into myofibroblasts with proliferative, fibrogenic and contractile capability, playing a role in the setting of liver fibrosis and in the control of liver blood flow. In this work, stellate cells derived from an adult normal rat were isolated and cultured

1 Con el objetivo de caracterizar las poblaciones encontradas se utilizaron tinciones de albúmina, pero el anticuerpo (anti albúmina humana) no dio la reacción cruzada esperada con la población de morfología correspondiente a células parenquimatosas hepáticas (hepatocitos)

for a period of eight weeks. No enzymatic treatment or changes in surface adhesion were performed in order to observe the evolution of the cultured cells in this long-term primary culture.

Oil-Red O stain was used to visualize intracytoplasmic vesicles containing vitamin A (droplets), which were observed 24 hours after seeding the cells which developed a fibroblastoid appearance. These drops decreased to almost undetectable levels at the end of the period under study. The expression of alpha-SMA was given after 7 days of culture, and was maintained throughout the study period with fluctuations.

Expression of Nestin and CD 133 were also studied. Both markers are expressed in cells with regenerative capacity. As in some tumors, both were observed in cultured cells as of 24 hours after seeding and throughout the period under study.

In addition, other cell populations with different morphologies that could not be characterized were found. Morphological changes mainly associated with the size of the extensions of the cells when compared with the control group were observed in those cell cultures treated with enriched medium.

This model of long-term primary culture resembles a fibrotic liver, due to the cells and markers that are expressed. Hepatic stellate cells play an important functional role in this process. This is the reason why the knowledge of its features may allow us in the future to modulate their phenotype and thus use these cells as potential therapeutic targets in damage situations.

BIBLIOGRAFIA

1. Burt AD, Robertson JL, Heir J, MacSween RNM. *J Pathol* 1986;150:29-35.
2. Geerts A *J Hepatol*, 40 (2004), pp. 331-334
3. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. *Comparative Hepatology* 2007; 6: 1-13.)
4. Hendriks HKJ, Brouwen A, Knook DL. *Hepatology*, 1987; 7: 1368.
5. Ishiwata, T Matsuda Y, Naito Z. *World J Gastroenterol*, 2011 Jan 28;17 (4):109-18, Jasani B, Schmid KW. 1993).
6. Kordes Claus, Sawitza Iris y col. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007; 352: 410-417.
7. Lillie, R.D. and Ashburn, L.L., *Arch. Pathol.*, v. 36, 432-435 (1943).
8. Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT., *Blood*, 1997; 90: 5013-5021

9. Mizrak D, Brittan M, Alison MR. *CD133: molecule of the moment. J Pathol.* 2008 Jan; 214(1):3-9
10. Ramadori G, Vein T, Schwogle S, Dienes HP, Knittel T, Rieder H, Meyer zum Büschenfelde KH. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 1990; 59: 349-357.
11. Sasaki A, Kamiyama T, Yokoo H, Nakanishi K, Kubota K, Haga H, Matsushita M, Ozaki M, Matsuno Y, Todo S. *Oncol Rep.* 2010 Aug;24(2):537-46.
Sarem M, R. Znaidak a, M. Macías b y R. *Gastroenterol Hepatol.* 2006;29(2):93-101



MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN ALFA2-ADRENÉRGICA EN CÉLULAS TUMORALES DE MAMA HUMANA

Ariana Bruzzzone, Lucía Gargiulo, Cecilia Pérez Piñero, Lilian Fedra Castillo.
Instituto de Biología y Medicina Experimental CONICET.

CONTEXTO CIENTÍFICO Y OBJETIVOS

El cáncer de mama es el tipo de neoplasia más frecuente entre las mujeres^{1,2}. En Argentina se registran anualmente 5.400 muertes y se estima que se diagnostican 17.000 casos nuevos³. Es un problema relevante para la salud en nuestro país, como también lo es en la mayoría de los países del mundo. Con el incremento en la edad de la población femenina, la prevención y el tratamiento del cáncer de mama continúa siendo el principal desafío para luchar contra esta enfermedad.

Los datos epidemiológicos y experimentales sugieren que el estrés podría influenciar el crecimiento de ciertos tumores sólidos⁴. Los responsables y los mecanismos moleculares involucrados son aún desconocidos, lo que provoca que las consecuencias del estrés en el cáncer humano sean inciertas y controversiales.

Experimentos *in vivo* sugieren que los efectos del estrés son consecuencia de la regulación neuroendócrina del sistema inmune⁵. De todas formas, ya que no está probado que el sistema inmune desempeñe un rol en el desarrollo tumoral, una acción directa de los neuromediadores y hormonas del estrés sobre las células cancerosas es una hipótesis de trabajo que debe ser considerada.

La norepinefrina, neuromediador del sistema nervioso simpático, y la epinefrina, hormona producida por la médula suprarrenal, son los principales responsables de la respuesta al estrés. Estas catecolaminas ejercen sus efectos vía la estimulación de receptores adrenérgicos (RA). Estos receptores pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G, la mayor familia de receptores de membrana que controlan funciones fisiológicas

como neurotransmisión, liberación de hormonas y enzimas, regulación de la presión arterial, etc.

Los RA se clasifican en 3 tipos: α^1 , α^2 y β . Luego de la unión de las catecolaminas se produce un cambio conformacional que lleva a la activación de proteínas heterotriméricas que unen GTP, activándose diferentes vías de señalización. Los α^2 -RA se acoplan fundamentalmente a proteínas G de la familia Gi/o. Se encuentran involucrados en diversas funciones cardiovasculares y del sistema nervioso central⁶ y se subdividen en tres subtipos: α^{2A} , α^{2B} y α^{2C} -adrenérgicos. Los agonistas α^2 -adrenérgicos son muy utilizados en la clínica para el tratamiento de la hipertensión, glaucoma, síndrome de abstinencia y atención y anestesia general, mientras que los antagonistas se utilizan como vasodilatadores periféricos⁶.

Un estudio en ratones inmunodeprimidos inoculados con células tumorales ováricas humanas demostró que la elevación de los niveles circulantes de catecolaminas debidas al estrés ambiental provoca un aumento del volumen tumoral y del número de metástasis⁷. Estos efectos están mediados por la estimulación de receptores β -adrenérgicos y son consecuencia de un efecto pro-angiogénico que depende de un aumento de la expresión de VEGF y de metaloproteasas.

Estudios previos del laboratorio permitieron demostrar que diferentes líneas tumorales de mama humana expresan receptores α^2 -adrenérgicos⁸. La incubación con agonistas aumenta la síntesis de ADN y la proliferación celular y tumoral⁹. Sin embargo hasta el momento se desconocían los mecanismos de señalización implicados en esta respuesta.

Se sabe que los α^2 -RA pueden acelerar la proliferación de células normales y tumorales^{10;11} estimulando la actividad de MAPKs (Erk1 y Erk2). Los mecanismos responsables de este efecto dependen fundamentalmente del subtipo de receptor considerado y del tipo particular de célula en el que se expresa¹².

El objetivo de este pedido de subsidio fue estudiar las vías de señalización activadas en la respuesta proliferativa de los receptores α^2 -adrenérgicos en células tumorales de mama humana *in vitro*. También dentro de este marco, comenzamos a establecer nuevos modelos celulares que expresen proteínas recombinantes fácilmente identificables para el posterior estudio del rol de estos receptores *in vivo*.

RESULTADOS

Mecanismos de señalización adrenérgica en células MCF-7

Evaluamos el efecto de la catecolamina endógena Epinefrina (Epi) y de dos agonistas α^2 -adrenérgicos específicos: la dexmedetomidina (Dex) y el UK-14304 (UK) y un agonista β -específico el isoproterenol sobre la fosforilación de Erk1/2. La Epi, el UK y la Dex (todos a 2 μ M) causan un aumento de la fosforilación de Erk, mientras que la estimulación de los β -RA provoca una disminución de la misma. El aumento causado por los agonistas α^2 -específicos ocurre de manera dosis-dependiente a partir de 0,1 nM para Dex ($p < 0,05$) y a partir 1 fM ($p < 0,05$) para UK.

La cinética de acción para estos agonistas muestra que el aumento de la fosforilación de Erk1/2 ocurre a partir de los 10 minutos para la Dex y de los 20 minutos para el UK. Este fenómeno persiste en el tiempo, ya que aun 2 horas después de la estimulación se observan niveles de fosforilación muy superiores al nivel control. El efecto estimulador de epinefrina 10 nM se puede revertir con los antagonistas α^2 -específicos yohimbina y rauwolscina (ambos a una concentración 1 μ M). La incubación con el antagonista β -adrenérgico propranolol también revierte el efecto de la epinefrina, aunque de manera no significativa.

Para confirmar la activación de Erk1/2 en la línea MCF-7 se generó un modelo celular que permite medir la activación de Erk. Elk1 es un factor de transcripción dependiente de la vía de Erk, y Erk regula su actividad transcripcional. Para corroborar que Erk es efectivamente activado en estas células, se cotransfectaron las mismas de manera estable con el plásmido pFA2-Elk1 unido al gen reportero pFR-Luc. Como control de transfección y para establecer los clones se utilizó el plásmido pGFP-ZeoR. La incubación con UK y Dex 2 μ M aumenta la actividad de la luciferasa con respecto al control, confirmando de esta manera que en las células MCF-7, la activación α^2 -adrenérgica estimula la actividad de Erk1/2.

Se realizaron estudios para determinar el mecanismo por el cual los α^2 -RA inducen la activación de Erk1/2. Trabajos previos mostraban que estos receptores podían mediar la fosforilación de Erk mediante la transactivación del receptor para el EGF (EGFR). La preincubación de las células con el inhibidor de la actividad tirosina quinasa del REGF, el AG1478 no es capaz de inhibir el efecto de la Dex pero sí del EGF.

La incubación de las células con un inhibidor específico de c-src (PP2) bloquea totalmente el efecto de la Dex, mientras que el inhibidor de la fos-

folipasa-A2 quinacrina no es capaz de bloquear el efecto de la Dex. También se incubaron las células MCF-7 con diferentes inhibidores de la vía de PI3K y de PKC para evaluar si estas vías se encuentran involucradas en el aumento de la proliferación celular provocada por la incubación con compuestos adrenérgicos. Como inhibidores de la vía de PI3K se utilizaron Wortmanina y LY294002. Como inhibidores de la vía de PKC se utilizaron GO6976 y GO6983, todos a una concentración de 1 μ M, 30 minutos antes de la estimulación con Dex 2 μ M. Ninguno de estos inhibidores logró bloquear el efecto de la Dex, sugiriendo que la activación de Erk por los agonistas α^2 -RA en este modelo celular depende de la activación de Src, pero no de la transactivación del receptor de EGF ni de la activación de las vías de PLA2, PI3K ni de PKC.

Para confirmar este resultado se realizaron transfecciones con diferentes formas de c-src. Se utilizó la forma *wild type*, la forma constitutivamente activa y la forma inactiva de c-src. Además, estas células se cotrasfectaron con un plásmido que contiene Erk2 unido a la GFP. La expresión de la forma constitutivamente activa de c-src provoca un aumento en la fosforilación de ErkGFP con respecto a la fosforilación provocada por la expresión de c-src *wild type*, mientras que la forma inactiva inhibe por completo la fosforilación de ErkGFP. La Dex provoca un aumento en la fosforilación de ErkGFP cuando se expresa la forma *wild type* de c-src, pero no cuando se sobreexpresa la forma constitutivamente activa. Cuando se sobreexpresa la forma inactiva de c-src, la Dex no provoca ningún cambio en la fosforilación de ErkGFP. Estos resultados confirman que la estimulación α^2 -adrenérgica en la línea MCF-7 induce un aumento en la fosforilación de Erk1/2 dependiente de la activación de la vía de c-src.

Se evaluó también la activación de otra vía de señalización involucrada en la sobrevivencia celular, la vía de Akt. La incubación con Dex provoca un aumento en la fosforilación de Akt evidente a partir de los 120 minutos y que se sostiene al menos hasta los 180 minutos.

Efecto en otras líneas celulares de cáncer de mama.

Se estudiaron otras líneas para corroborar los resultados. Tanto en la línea HS-578T como en la línea MDA-MB-231 la incubación con UK14304 provoca un aumento en la fosforilación de Erk1/2.

Creación de modelos celulares para el estudio de los efectos de los receptores α^2 -adrenérgicos sobre el crecimiento de tumores mamarios *in vivo*.

Se generaron modelos celulares derivados de las líneas MCF-7 e IBH-6. En una primera aproximación, se transfectaron las células con diferentes plásmidos que expresan proteínas fácilmente identificables: los plásmidos utilizados fueron pGFP2-Zeo y pCherry-Zeo, y se establecieron los clones luego de la selección por citometría de flujo. En la tabla a continuación se detalla la nomenclatura dada a estas nuevas células:

Línea Celular parental	pCherry-Zeo	pGFP2-Zeo
MCF-7	Cherry (A)	Menta (B)
IBH-6	Cérise (C)	Kiwi (D)

El siguiente paso en este proyecto fue evaluar la capacidad de crecer *in vivo* de estas células en ratones inmunodeficientes. Para ello, cada línea se inoculó por separado en ratones NUDE hembras vírgenes de 2 meses de edad, con o sin *pellets* de 17β -estradiol según lo descrito en la literatura^{13 14}.

Mediante el uso de un bioluminómetro, se pudo seguir el crecimiento de estas líneas *in vivo*. Se pudo seguir el crecimiento de las líneas Cherry y Menta durante al menos 45 días. La línea Kiwi también puede seguirse, mientras que la expresión de la proteína cherry en la línea Cérise no fue lo suficientemente fuerte como para detectarse por esta metodología.

También se co-inocularon las líneas Cherry y Menta en el mismo flanco del mismo ratón, para ver si con esta metodología podían seguirse ambas poblaciones por separado. Ambas líneas pueden seguirse de manera independiente.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permitieron identificar los mecanismos de señalización por el cual la estimulación α^2 -adrenérgica estimula la proliferación de las células tumorales de mama humana. La incubación con agonistas α^2 -adrenérgicos provoca un aumento en la fosforilación de Erk1/2 dependiente de la src. Las vías de PLA2, PI3K y PKC no se encuentran involucradas, así como tampoco es dependiente de la transactivación del receptor de EGF.

Los compuestos adrenérgicos estimulan la proliferación de las células

tumorales activando también la vía de Akt relacionada con la supervivencia celular.

Se lograron obtener clones celulares provenientes de líneas de cáncer de mama humano que expresan proteínas fluorescentes. Algunos de estos clones lograron crecer en ratones inmunodeprimidos y se logró seguir el crecimiento de estas líneas *in vivo* mediante el uso de un bioluminómetro. El desarrollo de estos clones y la puesta a punto es una valiosa herramienta que servirá para el futuro estudio del rol de estos receptores en el crecimiento tumoral y en el desarrollo de metástasis.

ABSTRACT

Breast cancer is the most frequent cancer in woman¹. Experimental data suggest that stress could influence tumor growth² but the molecular mechanisms involved are not known yet. Stress consequences in cancer are controversial. Epinephrine and norepinephrine, typically released during stress, bind to adrenoceptors (AR) which classically control the cardiovascular and respiratory systems. α^2 -AR are expressed in human breast cancer³ and their stimulation is associated with increased cell proliferation and tumour growth⁴. We proposed to study the molecular pathway involved in proliferative response of the α^2 -AR in human breast cancer cell. We also developed new cellular models for the future study of these receptors *in vivo*.

Epinephrine and the α^2 -adrenergic agonists (dexmedetomidine and UK14304) induced an increase in Erk1/2 phosphorylation in MCF-7 cell line. Both agonists induced a dose-response increase from 0,1 nM ($p < 0,05$) for dexmedetomidine and 1 fM ($p < 0,05$) for UK14304. α^2 -antagonists yohimbine and rauwolscine could reverse the epinephrine effect. To confirm the activation of Erk in MCF-7, cells were transfected with pFA2-Elk1/pFR-Luc plasmid. Incubation with α^2 -agonists induced an increase of luciferase activity. The s-src inhibitor abolished the effect of Dexmedetomidine, showing that Erk1/2 phosphorylation in MCF-7 depends of c-src activation. This result was confirmed transfecting cells with different form of c-src (wild type, active c-src and active form). The pathways that implied EGFR transactivation PKC, PLA2 or PI3K were not involved. The α^2 -effect on Erk1/2 phosphorylation was confirmed in other human breast cell lines. Dexmedetomidine increased Akt phosphorylation in MCF-7 cells too.

New clones of human breast cancer cells expressing pGFP2-Zeo or

pCherry-Zeo plasmids were performed. Clones were sorted with a flow cytometry and inoculated to nude mice. *In vivo* growth could be followed using a bioluminometer. These clones will be an important tool for the study of adrenergic receptors role in tumor growth and metastases development.

REFERENCIAS

1. A. Jemal, R. Siegel, J. Xu, E. Ward, *CA Cancer J.Clin.* 60, 277-300 (2010).
 2. J. Ferlay, D. M. Parkin, E. Steliarova-Foucher, *Eur.J.Cancer* 46, 765-781 (2010).
 3. Viniegra, M., Paolino, M., and Arrossi, S. Cáncer de mama en Argentina: organización, cobertura y calidad de las acciones de prevención y control. Organización Panamericana de la Salud-OPS, 1-141. 2010. Organización Panamericana de la Salud-OPS. 1-8-2010.
- Ref Type: Serial (Book, Monograph)
4. M. H. Antoni et al., *Nat.Rev.Cancer* 6, 240-248 (2006).
 5. R. Glaser and J. K. Kiecolt-Glaser, *Nat.Rev.Immunol.* 5, 243-251 (2005).
 6. K. Gyires, Z. S. Zadori, T. Torok, P. Matyus, *Neurochem.Int.* 55, 447-453 (2009).
 7. P. H. Thaker et al., *Nat.Med.* 12, 939-944 (2006).
 8. S. M. Vazquez et al., *Cancer Chemother.Pharmacol* 58, 50-61 (2006).
 9. A. Bruzzone et al., *Br.J.Pharmacol.* (2008).
 10. D. Cussac et al., *Am J Physiol Renal Physiol* 282, F943-F952 (2002).
 11. B. Buffin-Meyer et al., *Eur.J.Pharmacol.* 574, 85-93 (2007).
 12. K. L. Pierce, L. M. Luttrell, R. J. Lefkowitz, *Oncogene* 20, 1532-1539 (2001).
 13. A. Bruzzone et al., *J.Cell Physiol* 219, 477-484 (2009).
 14. C. K. Osborne, K. Hobbs, G. M. Clark, *Cancer Res.* 45, 584-590 (1985).



“PARTICIPACIÓN DEL COMPLEMENTO CROMOSÓMICO SEXUAL (XX E XY) EN EL DIMORFISMO SEXUAL CARDIOVASCULAR”

Dra. X. E. Caeiro

Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra

A lo largo de la historia, la mayor parte de los estudios clínicos y experimentales han sido llevados a cabo en machos o en caso de incluir ambos sexos no se tenía en cuenta, al momento de realizar el análisis de los datos, al sexo como un factor. Este abordaje se corresponde con la línea de la hipótesis clásica de los orígenes de las diferencias sexuales, la cual prevaleció hasta el final de la década del '90, que sostiene que el dimorfismo sexual de tejidos no gonadales es consecuencia de la acción epigenética de los esteroides gonadales. Según esta hipótesis, la organización de los tejidos no gonadales del tipo masculino es el resultado de la acción de los andrógenos secretados por el testículo durante el “periodo crítico” del desarrollo, mientras que la organización de tejidos no gonadales de fenotipo femenino se produce en ausencia de las secreciones testiculares, cualquiera sea el sexo cromosómico (Carrer y cols., 2002; Davies y Wilson, 2006). Evidencias que apoyan esta hipótesis demuestran que hembras XX desarrollaban un fenotipo masculino cuando son tratadas con testosterona, mientras que machos XY muestran un fenotipo femenino cuando los efectos de la testosterona son bloqueados; asumiendo de este modo que las diferencias reportadas entre machos y hembras podían ser explicadas por la sola acción diferencial de las hormonas gonadales. Si bien no se puede negar el rol indiscutible de los esteroides gonadales en el dimorfismo sexual, estudios llevados a cabo a partir de finales de la década del 80' demostraron que algunas características sexualmente dimórficas surgen con anterioridad a la diferenciación gonadal y por lo tanto no podían ser explicadas como resultado de la acción organizadora de las hormonas gonadales (Cambiasso y cols., 1995; 2000; De Vries y cols., 2002). Es importante destacar que machos y hembras no sólo difieren respecto a la presencia de testículos y ovarios (factor hormonal), sino que además sus células son portadoras de diferentes complementos cromosómicos (XY y XX respectivamente-factor genético). Todos estos antecedentes

permiten por lo tanto inferir que los genes ligados a los cromosomas sexuales podrían determinar (directa o indirectamente) parte del dimorfismo sexual, actuando independientemente del fenotipo gonadal. Es así entonces, que las vías genéticas y/o hormonales podrían actuar independientemente o interactuar (sinérgica/antagónicamente) para así modular el desarrollo sexual dimórfico (teoría unificada del dimorfismo sexual).

Un importante número de estudios indican un perfil dimórfico sexual en la incidencia de enfermedades cardiovasculares. Si bien el factor hormonal juega un papel trascendental en el dimorfismo sexual, no todas las diferencias entre machos y hembras pueden ser explicadas por la sola acción de hormonas gonadales. De ello surge el siguiente interrogante: ¿el complemento cromosómico sexual (XX e XY) modula diferencialmente la respuesta cardiovascular en machos y hembras? Evidencias (tanto clínicas como experimentales) indican que las acciones de angiotensina II (ANG II) en el sistema nervioso central modularían diferencialmente los parámetros cardiovasculares en machos y hembras (Sullivan, 2008). ANG II es un péptido que además de sus acciones vasoconstrictoras a nivel periférico, produce un incremento en la actividad simpática, una disminución en la actividad parasimpática y modula entre otros, la sensibilidad del reflejo baroreceptor (Cox y Bishop, 1991; Gandhi y cols., 1998). En pacientes normotensos, incrementos en la presión arterial (PA) inducidos por la administración aguda de ANG II conllevan a una mayor disminución en la frecuencia cardíaca (FC) en mujeres que en hombres (Gandhi y cols., 1998). Del mismo modo, la administración aguda de este péptido en ratones machos, tanto intactos como castrados, desencadena una sensibilidad barorefleja significativamente menor que aquella inducida por fenilefrina (FE). Sin embargo, es importante destacar que la sensibilidad barorefleja diferencial a la administración aguda de ANG II vs. aquella resultante de la infusión de FE, sólo se observa en machos; siendo la sensibilidad barorefleja en hembras similar para estos dos agentes presores (Pamidimukkala y cols., 2003).

Sobre la base de estas evidencias en el presente proyecto pusimos a prueba nuestra hipótesis de trabajo por la cual sostenemos que la respuesta sexual dimórfica barorefleja inducida por la administración aguda de ANG II es debida a diferencias intrínsecas del complemento cromosómico sexual y no a los efectos organizacionales de los esteroides gonadales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo experimental Con el fin de estudiar el rol del complemento cromosómico sexual en relación a la respuesta sexual dimórfica de la sensibilidad barorefleja mediada por ANG II y FE, empleamos una cepa de ratón transgénico originalmente desarrollado por Burgoyne el cual combina una mutación espontánea del gen determinante de testículos, Sry (del inglés Sex determining Region of the Y chromosome) con la incorporación del transgen Sry en un cromosoma autosómico. La delección del gen Sry de ratones macho cromosómico (XY-) resulta en un fenotipo femenino (ovarios). Cuando el transgen Sry es insertado en un autosoma de estos ratones (XY-Sry), poseen testículos y son fértiles. Es así entonces que el cruzamiento de ratones XY-Sry con hembras normales XX produce una progenie de 4 tipos: hembras XX, hembras XY- (sin Sry en el cromosoma Y), machos XXSry y machos XY-Sry (ambos con el gen Sry en un cromosoma autosómico). Los machos XY-Sry y XXSry fueron designados como XY machos y XX machos, mientras que a las hembras XX y XY- se las denominó como XX hembras y XY hembras respectivamente. La comparación de un carácter entre estos 4 grupos permite la valoración independiente de los efectos de los factores: a) sexo, comparando machos versus hembras (es decir aquellos con testículos vs. aquellos ratones con ovarios), b) complemento cromosómico, comparando XY hembras vs. XX hembras y XY machos vs. XX machos y c) su interacción. Este abordaje permite así analizar de qué manera las diferencias genéticas asociadas a los cromosomas sexuales y las secreciones gonadales modifican el sustrato morfológico y funcional que subyace al dimorfismo sexual cardiovascular.

Diseño experimental Ratones de 45-50 días de edad correspondientes a los cuatro genotipos fueron gonadectomizados y una vez transcurridos 10 días, fueron nuevamente anestesiados con ketamina-xilazina (100 mg/kg y 10 mg/kg), para así canular la carótida y yugular (Caeiro y cols. al., 2006). Transcurridos 5 días de la canulación, y con el objetivo de evaluar en ratones conscientes y con libertad de movimiento, la PA y FC, la cánula en la carótida fue conectada al transductor de PA acoplado a un sistema de adquisición de datos (Power Lab, Ad Instruments). Registrados los parámetros basales de PA y FC, se evaluó la respuesta barorefleja cardiaca estimulada por incrementos en la PA inducidos por PE (1.0 mg/ml) y ANG II (100 mg/ml). Los agentes presores fueron administrados aleatoriamente en cada uno de los animales. Una vez transcurridos 45-60 minutos posteriores a la inyección del

primer agente y teniendo en consideración que la PA y FC hubieran retornado a los niveles basales, se procedió a administrar el segundo agente presor (ANG II o FE). En un grupo paralelo de animales, se evaluaron los cambios en la FC resultado de la progresiva disminución de la PA inducida por la infusión aguda de nitroprusato de sodio (6.0 µg/min). Las tasas de infusión (0.003 ml/min) fueron monitoreada de modo tal de producir cambios en la PA dentro del rango de 30-40 mmHg en un periodo de 45-60 segundos.

Análisis estadístico Las respuestas barorefleja bradicárdica y taquicárdica fueron analizadas mediante un análisis de regresión lineal. Los delta de FC correspondientes a cambios de 30 mmHg de PA fueron sujetos a un análisis de varianza (ANOVA) y cuando se reconocieron diferencias significativas los mismos fueron sometidos al test post-hoc de Tukey con un nivel de significación fijado en $p < 0.05$. La respuesta barorefleja a la infusión de PE, ANG II y SNP fue separadamente analizada por un ANOVA a dos vías considerando al sexo gonadal (macho/hembra) y SCC (XX/XY) como factores independientes. La respuesta bradicárdica comparativa de la respuesta barorefleja de PE vs. ANG II en cada genotipo fueron analizadas por un ANOVA de una vía empleando a los agentes presores como factores independientes (PE/ANG II). Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar.

RESULTADOS

Como se puede observar en la Tabla 1 animales perteneciente a los diferentes genotipos presentaron niveles basales similares de FC y PA (PA media, PA sistólica y PA diastólica).

Tabla 1. Parametros basales de presión arterial y frecuencia cardíaca

Parámetros	Genotipo			
	XY Macho	XX Macho	XX Hembra	XY Hembra
PAM (mmHg)	111 $\pm$ 5	111 $\pm$ 6	108 $\pm$ 8	113 $\pm$ 9

Participación del CCS en la respuesta dimórfica sexual bradicárdica barorefleja resultante de la administración de PE y ANG II (Figura 1) El análisis de las respuestas bradicárdicas baroreflejas de la administración de PE en los 4 genotipos reveló que ratones XY hembra presentaron una sensibilidad barorefleja significativamente menor a la reportada en los otros

genotipos (Fig 1A). Por su parte, la administración de ANG II produjo, independientemente del fenotipo gonadal, una sensibilidad barorefleja diferente en ratones portadores del complemento cromosómico sexual XX respecto a la respuesta observada en ratones pertenecientes al grupo XY (tanto XX hembras como XX machos presentaron una sensibilidad barorefleja mayor que aquella reportada para XY hembras y XY machos) (inserto en Fig 1B).

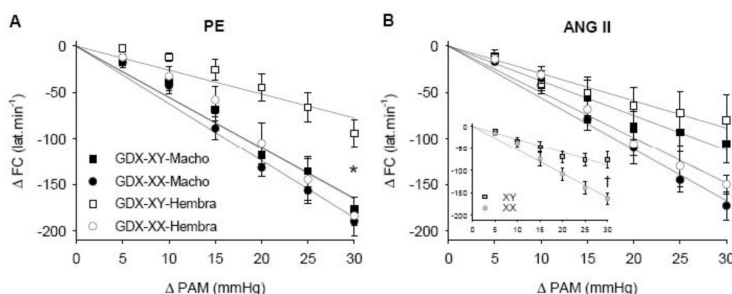


Figura 1. Líneas de regresión lineal relacionando cambios en la frecuencia cardiaca (FC) que surgen como resultado de incrementos de la presión arterial media (PAM) inducida por la infusión de fenilefrina (FE, panel A) y Ang II (panel B) en ratones gonadectomizados (GDX) conscientes con libertad de movimiento. Delta FC (Δ FC); delta PAM (Δ PAM). XY Macho (n=6), XX Macho (n=6), XY Hembra (n=6) y XX Hembra (n=5).

Participación del CCS en la respuesta barorefleja taquicárdica resultante de la administración de nitroprusato de sodio (SNP) (Figura 2)

A diferencia de lo que ocurre en la respuesta barorefleja bradicárdica que surge de la administración de ANG II y FE, en la cual se reporta una acción moduladora del factor cromosómico sexual en la respuesta dimórfica de ANG II y una interacción entre el factor hormonal (organizador) y cromosómico en el caso de FE, no se observó ante la administración aguda de, SNP una respuesta taquicárdica diferencial en animales pertenecientes a los diferentes genotipos.

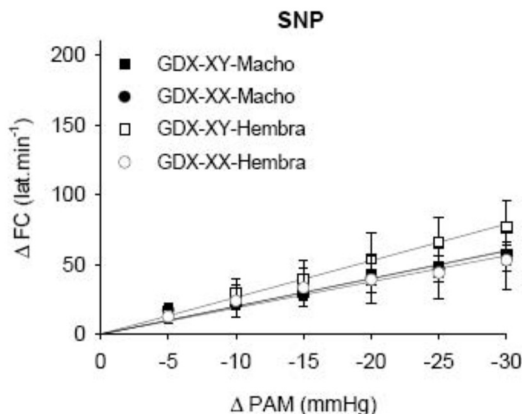


Figura 2. Líneas de regresión lineal relacionando incrementos en la FC resultado de la disminución de la PA inducida por la infusión de nitroprusato de sodio en ratones gonadectomizados (GDX) conscientes con libertad de movimiento. Delta frecuencia cardíaca (Δ FC); delta presión arterial media (Δ PAM) XY Macho (n=6), XX Macho (n=8), XY Hembra (n=7) y XX Hembra (n=5).

Análisis comparativo de la respuesta bradicárdica resultante de la administración de PE y ANG II: rol del complemento cromosómico sexual (Figura 3)

El análisis estadístico de la respuesta bradicárdica barorefleja en respuesta a la infusión de ANG II y PE en ratones XY machos demostró como era de esperar, una respuesta bradicárdica atenuada ante la administración de ANG II vs. PE. En contraposición, el delta de FC en XX machos, XX hembras y XY hembras fue similar para los dos agentes presores. Sin embargo cabe destacar que XX hembras y XX machos presentaron, tanto para ANG II como para PE, una respuesta bradicárdica más acentuada que la reportada para XY hembras. En particular, la comparación de la respuesta bradicárdica barorefleja en ratones hembras con diferente complemento cromosómico sexual (XX hembras vs. XY hembras) demostró que, independientemente de la droga administrada (PE o ANG II), ratones hembras portadores del complemento cromosómico sexual XX presentaban una respuesta bradicárdica facilitada respecto a la reportada para las XY hembras. A mismos incremento en la PA (aumento de 30 mmHg), ratones XX hembras presentan una mayor disminución en la FC (169.11 ± 13.24 lat.min⁻¹) vs. aquella observada para el grupo de XY hembras (-82.82 ± 20.82 lat.min⁻¹).

DISCUSIÓN

El sistema angiotensinérgico juega un papel fundamental en el control de la presión y volumen de fluidos y alteraciones en su actividad se relacionan con el desarrollo y mantenimiento de enfermedades renales y cardiovasculares. Históricamente, la mayor parte de los estudios epidemiológicos y experimentales referidos en la progresión de enfermedades y en la efectividad de tratamientos terapéuticos de las mismas han sido realizados en machos, asumiendo que machos y hembras son similares pero difieren entre si en la magnitud de la respuesta. Sin embargo es importante destacar que hembras y machos no responden de igual manera al tratamiento de la hipertensión con inhibidores

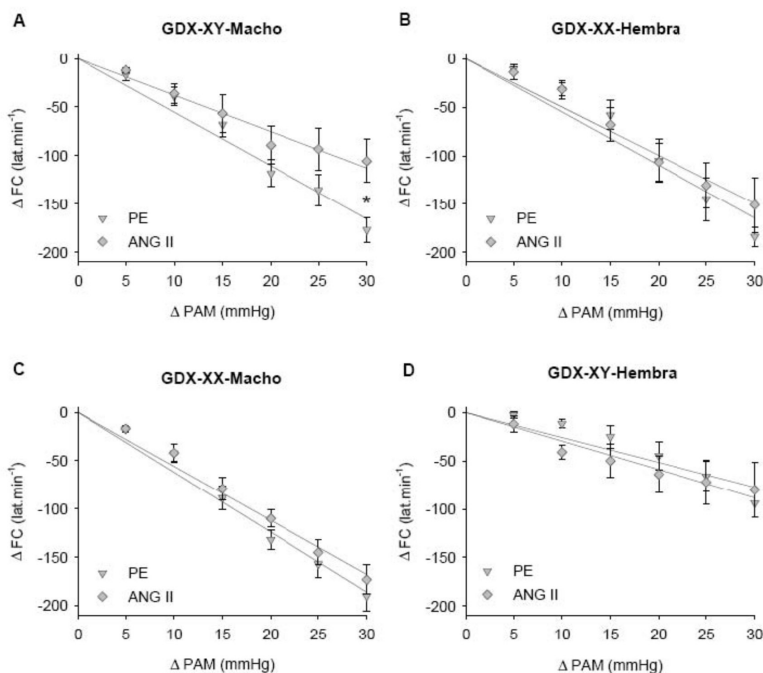


Figura 3. Líneas de regresión lineal relacionando cambios en la frecuencia cardiaca (FC) que surgen como resultado de incrementos de la presión arterial media (PAM) inducida por la infusión de fenilefrina y Ang II en cada genotipo. Delta FC (ΔFC); delta PAM (ΔPAM). XY Macho (n=6), XX Macho (n=6), XY Hembra (n=6) y XX Hembra (n=5).

del sistema renina angiotensina, lo cual refleja una respuesta dimórfica cardiovascular del sistema angiotensinérgico (Sullivan, 2008). El reflejo baroreceptor actúa como un sistema amortiguador de la PA modulando la actividad nerviosa simpática y en la mayor parte de los modelos experimentales de hipertensión se observa una reducción en la sensibilidad barorefleja y/o reseteo de la curva barorefleja hacia una PA más elevada. Los resultados que se desprenden del presente trabajo demuestran un rol modulador del complemento cromosómico sexual sobre la respuesta bradicárdica barorefleja que surge de la administración de ANG II y FE, demostrando una acción facilitadora del complemento cromosómico sexual XX. Estos datos en conjunto con datos de otros autores indican que tanto el complemento cromosómico sexual (y por lo tanto los genes ligados a los cromosomas sexuales) y los efectos (activadores y organizadores) de los esteroides gonadales participan del dimorfismo sexual bradicárdico (Caeiro y cols., 2011 Pamidimukkala y cols., 2003). ANG II, ejerce sus acciones por medio de dos subtipos de receptores: AT1R y AT2R. La activación de AT1R conlleva a la elevación de la PA debida a su acción vasoconstrictora, liberación de aldosterona, disminución de la tasa de filtración glomerular y reabsorción de sodio (Arebaillou 1999). Además de estas acciones a nivel periférico, los AT1R también ejercen funciones a nivel central entre las que se incluyen la liberación de vasopresina, ingesta de agua y sodio y un incremento en la actividad simpática. Sin embargo, la importancia del receptor AT2R es motivo de controversia (De Gaspar y Siragy, 1999). Aunque su expresión en tejidos embrionarios sugiere un papel durante el desarrollo (Ciuffo y cols., 1993) su expresión en tejidos adultos es menor y dependiente de la especie en estudio. Estudios llevados a cabo en pacientes y en ratones macho han demostrado una clara expresión del receptor a nivel de los vasos sanguíneos y glomérulos, modulando el flujo vascular y renal (Saavedra y cols., 2001, Matsubara y cols., 1998, Arina y cols., 1997, Carey y cols., 2001, Sandberg y cols., 2000, Jin y cols., 1998). La unión de ANG II a los receptores AT2R tiene efectos contrapuestos a los mediados por los AT1 e induce vasodilatación, que involucra el incremento en la producción de bradiquinina y óxido nítrico (Kaschina y Unger, 2003, Arina y cols., 1997). Estudios llevados a cabo por Armando y cols. (2002) han demostrado una expresión dimórfica sexual de receptores AT1R/AT2R a nivel renal, siendo la expresión de AT1R menor y la de AT2R mayores en ratones hembras vs. machos. Si bien los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a las diferencias sexuales en la modulación de la respuesta barorefleja e hipertensión inducida por ANG II son aun desconocidas, es

aceptado que la hipertensión y la atenuación de la respuesta bradicárdica mediada por la administración de ANG II observada en machos, sería debida a acciones centrales de dicho péptido en los órganos circunventriculares, en particular a nivel del área postrema (AP). El AP es un órgano circunventricular del tronco encefálico que se encuentra sujeto a la modulación tanto neural como humoral. Las neuronas del AP son activadas por un importante número de neuropéptidos entre los que se incluyen la ANG II y vasopresina. Por otra parte, el AP envía proyecciones a un número importante de centros neuronales involucrados en la regulación cardiovascular modulando así la actividad simpática-parasimpática y la respuesta barorefleja (Blessing y cols., 1987; Shapiro y Miselis, 1985).

Teniendo en cuenta: a) estudios propios que indican que las diferencias reportadas por otros autores entre machos y hembras con respecto a la respuesta diferencial bradicárdica barorefleja inducida por ANG II, serían debidas a diferencias atribuibles al CCS y no al efecto organizadores de los esteroides gonadales; b) que a nivel central los órganos circunventriculares juegan un rol indispensable en la respuesta presora y bradicárdica sexualmente dimórfica, c) que la acción de ANG II es mediada por los receptores AT1R y AT2R (cuyas acciones son contrapuestas) y d) que el gen AT2R (*Agtr2*) está localizado en el cromosoma X (De Gasparo y cols., 2000; Koike y cols., 1994), mientras que el gen AT1R (*AGTR1*) se localiza en un cromosoma autosómico 3 (Szpirer y cols., 1993), es tentador especular que los genes que residen en los cromosomas sexuales (que son heredadas asimétrica entre machos y hembras) bien podría influir en la génesis y mantenimiento del dimorfismo sexual (Davies y Wilkinson, 2006). Si este es el caso, la transcripción o expresión diferencial de AT1R/AT2R bien podría influir en la respuesta dimórfica cardiovascular angiotensinérgica. Los resultados del presente trabajo permiten contribuir al conocimiento de los mecanismos que participan en la respuesta bradicárdica sexualmente dimórfica. Machos y hembras utilizan diferentes componentes de los sistemas hidroelectrolítico y cardiovascular para alcanzar la homeostasis. A sabiendas de que existen estas diferencias, el esclarecimiento de las diferencias así como de las similitudes entre sexos permitirá en un futuro el diseño de adecuados instrumentos de diagnóstico, el reconocimiento de la fisiopatología específica de un sexo y la aplicación de tratamientos adecuados de las enfermedades cardiovasculares en machos (hombres) y las hembras (mujeres).

Quisiera recalcar que los resultados expuestos en este informe han sido recientemente aceptados para su publicación en *Hypertension*: Caeiro XE,

Mir F, Vivas L, Carrer HF, Cambiasso MJ "Sex Chromosome Complement contributes to sex differences in bradycardic baroreflex response". Hypertension. 2011;58:00-00 (en prensa) -Envío adjunta la prueba de galera.

ABSTRACT

Angiotensin II (Ang II) is a potent circulatory peptide known to modulate reflex regulation of heart rate and sympathetic activity. Clinical and experimental evidence show gender-related differences in Ang II-mediated effects on cardiac baroreflexes. While Ang II infusion produces similar increases in blood pressure in both male and female, in male, reflex decreases in heart rate are blunted relative to those observed in female. To investigate whether sex chromosome complement modulates bradycardic baroreflex response and contributes to the Ang II-bradycardic baroreflex sex differences, we used the four core genotype mouse model in which the effect of gonadal sex and sex chromosome sex is dissociated, allowing comparisons of sexually dimorphic traits among XX and XY females as well as in XX and XY males. In conscious gonadectomized transgenic mice we evaluated baroreflex regulation of heart rate in response to changes in blood pressure evoked by phenylephrine (1.0 mg/ml), Ang II (100 µg/ml) and sodium nitroprusside (1 mg/ml). The basal values of arterial pressure and heart rate before evaluation of baroreflex function were comparable in animals from different genotypes. However in what it refers to baroreflex response, in XY male and female mice, the slope of Ang II-induced baroreflex bradycardia was significantly less than that observed in XX male and female mice. Furthermore, XY female mice showed an attenuated PE-bradycardic baroreflex response when compared to XX female, XX male and XY male mice. These data support the hypothesis that sex chromosome complement modulates bradycardic baroreflex response evoked by Ang II and phenylephrine administration. Elucidating the foundational sources of sexually dimorphic traits in the regulation of baroreceptor reflex may enable designing more appropriate sex-tailored therapeutic treatments in the future.

BIBLIOGRAFIA

1. Ardaillou R. (1999) Angiotensin II receptors. J Am Soc Nephrol. ;10 Suppl 11:S30-39.

2. Arima S, Endo Y, Yaoita H, Omata K, Ogawa S, Tsunoda K, Abe M, Takeuchi K, Abe K, and Ito S. (1997) Possible role of P-450 metabolite of arachidonic acid in vasodilator mechanism of angiotensin II type 2 receptor in the isolated microperfused rabbit afferent arteriole. *J Clin Invest* 100: 2816–2823.
3. Blessing WW, Hedger SC, Joh TH, Willoughby JO. (1987) Neurons in the area postrema are the only catecholamine-synthesizing cells in the medulla or pons with projections to the rostral ventrolateral medulla (C1-area) in the rabbit. *Brain Res.* 419:336-340.
4. Caeiro XE, Mir F, Vivas L, Carrer HF, Cambiasso MJ (2011) Sex Chromosome Complement contributes to sex differences in bradycardic baroreflex response.. *Hypertensión*; 58:00-00 (en prensa).
5. Caeiro X, Hansen C, Garcia N, Vivas L. (2006) β -Endorphin involvement in the regulatory response to body sodium overload. *Neuroscience* 13; 142(2):557-565.
6. Cambiasso MJ, Diaz H, Caceres A, Carrer HF. (1995) Neuritogenic effect of estradiol on rat ventromedial hypothalamic neurons co-cultured with homotopic or heterotopic glia. *J Neurosci Res.* 42:700-709.
7. Carey RM, Jin XH, and Siragy HM. (2001) Role of the angiotensin AT2 receptor in blood pressure regulation and therapeutic implications. *Am J Hypertens* 14: 98S–102S.
8. Carrer HF, Cambiasso MJ. (2002) Sexual differentiation of the brain: genes, estrogen, and neurotrophic factors. *Cell Mol Neurobiol.* 22(5-6):470-500.
9. Ciuffo GM, Viswanathan M, Seltzer AM, Tsutsumi K, and Saavedra JM. (1993) Glomerular angiotensin II receptor subtypes during development of rat kidney. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 265: F264–F271.
10. Cox BF, Bishop VS. (1991) Neural and humoral mechanisms of angiotensin-dependent hypertension. *Am J Physiol.* 261:H1284-H1291
11. Davies W, Wilkinson LS. (2006) It is not all hormones: alternative explanations for sexual differentiation of the brain. *Brain Res.* 1126:36-45.
12. De Gasparo M, Siragy HM (1999) The AT2 receptor: fact, fancy and fantasy. *Regul Pept.* 31;81(1-3):11-24. Review
13. De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52:415-472.
14. De Vries GJ, Rissmand EF, Simerly RB, Yang LY, Scordalakes EM, Auger

- CJ, Swain A, Lovell-Badge R, Burgoyne PS, Arnold AP. (2002) A model system for study of sex chromosome effects on sexually dimorphic neural and behavioral traits. *J Neurosci* 22: 9005-9014.
15. Gandhi SK, Gainer J, King D, Brown NJ. (1998) Gender affects renal vasoconstrictor response to Ang I and Ang II. *Hypertension* 31:90-96.
 16. Jin XH, Wang ZQ, Siragy HM, Guerrant RL, Carey RM. (1998) Regulation of jejunal sodium and water absorption by angiotensin subtype receptors. *Am J Physiol*. 275:R515–R523.
 17. Kaschina E, Unger T. (2003) Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press* 12(2):70-88. Review.
 18. Koike G, Horiuchi M, Yamada T, Szpirer C, Jacob HJ, Dzau VJ. (1994) Human type 2 angiotensin II receptor gene: cloned, mapped to the X chromosome, and its mRNA is expressed in the human lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 30; 203:1842-1850.
 19. Matsukawa S, Reid IA. (1990) Role of the area postrema in the modulation of the baroreflex control of heart rate by angiotensin II. *Circ Res* 67:1462-1473.
 20. Pamidimukkala J, Taylor JA, Welshons WV, Lubahn DB, Hay M. (2003) Estrogen receptor –alpha mediates estrogen facilitation of baroreflex heart rate responses in conscious mice. *Am J Physiol*; 284:R983-R989.
 21. Saavedra JM, Hauser W, Ciuffo G, Egidio G, Hoe KL, Jöhren O, Sembonmatsu T, Inagami T, and Armando I. (2001) Increased AT1 receptor expression and mRNA in kidney glomeruli of AT2 gene-disrupted mice. *Am J Physiol* 280: F71– F78.
 22. Sandberg K and Li H. (2000) Kidney angiotensin receptors and their role in renal pathophysiology. *Semin Nephrol* 20: 402–416.
 23. Shapiro RE, Miselis RR.J. (1985) The central neural connections of the area postrema of the rat. *Comp Neurol* 234:344-364.
 24. Sullivan JC (2008) Sex and the renin-angiotensin system: inequality between the sexes in response to RAS stimulation and inhibition. *Am J. Physiol*. 294: R1220-R1226.
 25. Szpirer C, Rivière M, Szpirer J, Levan G, Guo DF, Iwai N, Inagami T.J (1993) Chromosomal assignment of human and rat hypertension candidate genes: type 1 angiotensin II receptor genes and the SA gene. *J.Hypertens* 11:919-925.

IMPORTANCIA DEL SISTEMA OPG (OSTEOPROTEGERINA), RANKL (LIGANDO DEL RECEPTOR ACTIVADOR DEL FACTOR NUCLEAR KB) Y TRAIL (LIGANDO INDUCTOR DE APOPTOSIS RELACIONADO CON EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL) EN TUMORES MAMARIOS HUMANOS. INFLUENCIA DE LAS CÉLULAS ESTROMALES DE MÉDULA ÓSEA

Martínez LM*, Labovsky V¹*, Fernández Vallone VB, Hofer EL, Bordenave RH, Feldman L, Chasseing NA.

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

INTRODUCCIÓN

En la última década, se ha observado que el microambiente hematopoyético de médula ósea (MO), en particular, las células madre mesenquimales (MSC) podrían favorecer el desarrollo del tumor de mama como constituyentes del microambiente tumoral (MT). Dentro de éste se han encontrado fibroblastos asociados al tumor (TAF), macrófagos asociados al tumor (TAM), MSC y progenitores, SC-hematopoyéticas (HSC) y progenitores, etc (1). Nuestro laboratorio evaluó en la MO de pacientes con cáncer de mama (PCM) avanzado, libres de tratamiento y sin metástasis óseas y en MO, un menor n° de unidades formadoras de colonia fibroblásticas (CFU-F, 1CFU-F=1MSC) y de MSC de adherencia temprana (MSC que regulan la hematopoyesis, *in-vivo* e *in-vitro*, y son multipotenciales con capacidad migratoria), así como una disminución del % de MSC CD146+ como del índice de fluorescencia relativa de CD146 (marcador de MSC del nicho vascular, con mayor autorrenovación, plasticidad y migración) en comparación con las voluntarias sanas (VS) (2-5). De estos resultados se desprende que en este momento del desarrollo tumoral (estadio clínico-patológico avanzado) las MSC multipotenciales de alta capacidad de clonado y plasticidad no están en MO y posiblemente hayan migrado a otros nichos pre y metastáticos distinto a hueso o al tumor primario de mama en los estadios iniciales. Trabajos de los últimos años, demuestran que la actividad pro-tumoral de las MSC no sólo se efectiviza pues liberan factores de crecimiento, quimoquinas, componentes de matriz, MMPs y TIMPs, sino por su capacidad de diferenciación a TAF,

* Comparten primera autoría.

de transdiferenciación a un estadio de transición mesenquimal-epitelial, de favorecer en las células epiteliales tumorales mamarias (CEpTM) la hormona independencia a través del cambio de estas a un fenotipo semejante al estado de transición epitelial-mesenquimal (expresión de N-caderina, vimentina, Twist y Snail) y de inmunosupresión (6-11).

Por otra parte, un 60-70% de las PCM avanzado desarrollan metástasis óseas y en MO al año de establecer el diagnóstico del tumor primitivo y de éstos, sólo el 20% están vivos a los 5 años de descubrir la metástasis ósea (12). Más aún el 30% de los pacientes con cáncer de mama (estadio I, II, III) presentan micrometástasis en MO, y la misma puede ser un factor pronóstico de menor período libre de enfermedad post-tratamiento (13). Por lo tanto, ambos tejidos proveen un microambiente favorable donde las células tumorales pueden proliferar y así la MO y el hueso se convierten en un reservorio de la enfermedad. Las metástasis óseas han sido caracterizadas como osteocíticas u osteoblásticas y ambas representan los dos extremos del proceso de desregulación de la renovación del hueso normal (12). El aumento de la resorción ósea podría ser consecuencia de la presencia de las CEpTM en MO, sin descartar, un efecto indirecto por la presencia en la MO de factores solubles liberados por las CEpTM circulantes y/o del tumor primario u otro nicho metastásico (14-19).

Otra observación interesante, es que la relación entre las CEpTM y las MSC parece dual, y como las MSC pueden ser pro o anti-tumorales es un área de reportes contradictorios (20, 21). Las CEpTM liberan y/o expresan en su membrana SDF-1 y RANKL, que atraen a las MSC o TAF de MO al tumor primitivo o aun nicho pre-metastásico distinto de MO (22, 23). Por otro lado, las CEpTM pueden expresar los receptores (R) CXCR-4 y RANK, los cuales hacen que las células migren desde el tumor primario a MO y hueso por acción de SDF-1 y RANKL, respectivamente, liberados por células estromales de MO o por los fibroblastos, MSC, TAF, y endoteliales del MT o por los osteoblastos inmaduros de MO y hueso (16, 17, 22, 24-26). Más aún, se demostró que la expresión de RANK en la CEpTM humana del tumor primario, es un marcador predictivo de ocurrencia de metástasis ósea y de un menor período de tiempo de aparición de desórdenes óseos (27, 28).

En los últimos años, ha cobrado importancia el sistema RANKL-OPG-TRAIL en la regulación de la proliferación, supervivencia y migración de la CEpTM humana, pero los resultados son muy contradictorios y no está definido cómo se modifican durante la evolución tumoral, ni se conoce claramente cómo inciden las MSC. Estos factores actuarían en el desarrollo del tumor primario como en el proceso que lleva a la metástasis en MO y hueso.

La OPG puede ser liberada por las CEpTM y las MSC de MO (29). En el tumor primario, la OPG podría actuar como pro-tumoral, pues inhibe la acción apoptótica del TRAIL sobre la CEpTM, aunque hay resultados contradictorios (30, 31). Además, la OPG aumenta la sobrevivencia de la célula endotelial e induce la angiogénesis y como dijimos antes, favorece la sobrevivencia de la célula tumoral, especialmente con receptores hormonales negativos, sensible a TRAIL, y está relacionada con las metástasis ósea (32). En MO y hueso, la OPG de unirse a TRAIL favorecería la sobrevivencia de los osteoclastos y de algunas CEpTM y de unirse a RANKL, sería anti-osteoclastogénica, por lo tanto, puede ser pro o anti-tumoral (33-35).

El RANKL puede ser producido por las CEpTM, TAF y MSC del MT y MSC y osteoblastos de MO y hueso. En el hueso induce la osteoclastogénesis y en el MT la transformación del TAM en preosteoclastos y la proliferación (14, 36, 37). Por otro lado, algunos investigadores, sugieren que las CEpTM expresan RANK, no sólo para favorecer su migración a hueso al unirse a su ligando, sino también para inducir su proliferación, y que su expresión y la de RANKL en el epitelio mamario estaría regulada positivamente por Progesterona- Progesterona-R (38).

TRAIL puede ser producido por CEpTM, TAM, TAF y MSC del MT, así como por células del estroma de MO y osteoclasto, y uniéndose a los R TRAIL-R1 y TRAIL-R2 induce la apoptosis en células tumorales (30, 32, 39) y osteoclastos (34, 35). Sus otros R TRAIL-R3, TRAIL-R4 y OPG no pueden conducir a la apoptosis (40,41). Hasta el momento no se ha observado acción de TRAIL sobre células epiteliales mamarias normales (30, 32, 39).

Sin embargo, los resultados obtenidos sobre la expresión y liberación de estos factores en las células del cáncer de mama humano (tumor primario y líneas como MDA-MB-436 y 231, así como MCF-7 y T47D) son muy contradictorios, pues dependen del grado histológico, el estadio clínico del tumor, la presencia de RE y RP, el tipo de método de aislamiento de la CEpTM y su sistema de cultivo, el momento en que se extrajo la muestra antes o después de la quimioterapia, la presencia de metástasis óseas u en otros sitios, el tiempo de evolución del tumor *in-vivo* entre otros factores, etc.

En base a los comentarios anteriores, nuestro trabajo estuvo enfocado a evaluar la expresión y/o liberación de OPG, RANKL, RANK (RANKL-R), TRAIL, y TRAIL-R1-R4, en dos líneas de CEpTM metastásicas humanas: MCF-7 (hormona-dependiente) y MDA-MB-231 (hormona-independiente). Y a estudiar cómo las MSC de MO de las PCM avanzado (libres de tratamiento, y sin MTs en MO/hueso) y VS, modifican los procesos de proliferación y

apoptosis de ambas líneas para comenzar a entender el papel de las MSC de MO en el desarrollo del tumor de mama principalmente en estadios finales de la enfermedad.

Objetivos específicos

I) Evaluar el sistema OPG/RANKL/TRAIL en las CEpTM metastásicas humanas de las líneas MCF-7 y MDA-MB231 en condiciones de arresto y post-estímulo con 10% de suero bovino fetal (SBF) (48hs).

- a) Estudiar la expresión de OPG, RANKL y TRAIL.
- b) Estudiar la liberación de OPG, RANKL y TRAIL en los medios condicionados (MC) de los cultivos de las CEpTM.
- c) Estudiar la expresión de RANKL de membrana (RANKLm) en los cultivos de las CEpTM.
- d) Estudiar la expresión de los receptores (R): RANK y TRAIL-R1-R4 en los cultivos de las CEpTM.

II) Evaluar la influencia de las MSC de MO de las PCM (estadio clínico-patológico avanzado, libres de tratamiento y metástasis en MO/hueso) y VS en la regulación de los procesos de proliferación y apoptosis de las CEpTM metastásicas humanas de las líneas MCF-7 y MDA-MB231.

- a) Estudiar la liberación de OPG, RANKL y TRAIL en los MC de los cultivos de CFU-F (día 7 y 14) y de los cultivos de MSC (3^{er} pasaje, a baja densidad celular, día 6 y 12) de MO de las PCM avanzado y VS.
- b) Estudiar el efecto de los MC de los cultivos de CFU-F (día 7 y 14) y de los cultivos de MSC (3^{er} pasaje, a baja densidad celular, 12 días) de MO de las PCM avanzado y VS sobre la proliferación de las CEpTM de las líneas MCF-7 y MDA-MB-231.
- c) Estudiar el efecto de los MC de los cultivos de CFU-F (día 7 y 14) y de los cultivos de MSC (3^{er} pasaje, a baja densidad celular, 12 días) de MO de las PCM avanzado y VS sobre la apoptosis (en presencia o ausencia de TRAILrh) de las CEpTM de las líneas MCF-7 y MDA-MB-231.

Resultados

I) Evaluación del sistema OPG/RANKL/TRAIL en las CEpTM metastásicas humanas de las líneas MCF-7 y MDA-MB231 en condiciones de arresto y post-estímulo con 10% de SBF (48hs).

(Observaciones de 4 ensayos).

Estudio de la expresión de OPG, RANKL y TRAIL en las CEpTM

Por Western blot: en ninguno de los cultivos se observó la expresión de OPG, RANKL y TRAIL. Si se observaron las bandas correspondientes a los recombinantes con sus respectivos PM y al control positivo (Actina). No se observaron bandas en los controles negativos de isotipo y conjugado realizados.

Por Inmunofluorescencia indirecta: los ensayos mostraron una expresión para RANKL y TRAIL en el 100 % de las células para ambos tipos de líneas, tanto en condiciones de arresto como estímulo (Figura.1 A). Sin embargo, la expresión/célula fue > post-estímulo (moderada a intensa), independiente del tipo de línea utilizada. Respecto a la producción de OPG, el 100% de las células lo expresaron en ambas líneas tumorales y la intensidad fue leve en condiciones de arresto, independiente del tipo de línea utilizada y aumentó a moderado post-estímulo. En ninguno de los controles negativos se observó marcación (Figura.1 B).

Estudio de la liberación de OPG, RANKL y TRAIL en los MC de los cultivos de las CEpTM por la técnica de ELISA: en condiciones de arresto ambos tipos celulares liberaron OPG en una concentración mínima y luego del estímulo con SBF, se observó un incremento significativo de la liberación de este factor, a saber (Test no apareado de Student con corrección de Welch): MDA-MB-231 ($p=0,0158$) y MCF-7 ($p=0,0056$). Los niveles más altos de OPG se cuantificaron en los MC de las CEpTM de la línea MCF-7 respecto a la línea MDA-MB23 (post-estímulo: $p=0,0130$; Test no apareado de Student con corrección de Welch). Figura.2.

Respecto a los niveles de RANKL y TRAIL liberados, en estas condiciones de cultivo, independiente de la línea analizada, fueron £ a la dosis mínima detectable en el ensayo de ELISA respectivo (31,25 pg/ml). Cada muestra fue realizada por triplicado y el experimento fue repetido cuatro veces.

Estudio de la expresión de RANKL membrana (RANKLm) en los cultivos de las CEpTM por Inmunocitoquímica: se encontró expresión positiva tanto para RANKLm y RANKL citoplasmático en el 100 % de las células de ambas líneas celulares (Figura.3). Además, pudimos observar expresión positiva para la citoqueratina AE1-AE3, control positivo, y no se encontró inmunomarcación en las células de las líneas MDA-MB-231 ni en las MCF-7 cuando se hicieron los controles negativos, se ejemplifica el control con Igs total de conejo.

Estudio de la expresión de RANK en los cultivos de las CEpTM por Inmunocitoquímica: el 100% de las células, independiente del tipo de línea

utilizada, expresaron RANKm y RANK citoplasmático (RANKc), no modificándose la intensidad de expresión post-estímulo con 10% de SBF. En ninguno de los controles negativos se observó marcación y el control de AE1-AE3 dio expresión positiva en el 100% de las CEpTM de ambas líneas (Figura 4).

Estudio de la expresión de TRAIL-R1, R2, R3 y R4 en los cultivos de las CEpTM por inmunocitoquímica: se encontró que independiente del tipo celular, el 100% de las células expresan TRAIL-R1 y R4, 30-50% TRAIL-R2 y 40-55% TRAIL-R3, no modificándose la expresión/célula post-estímulo (Figura. 5). En ninguno de los controles negativos se observó marcación y AE1-AE3 dio expresión positiva en el 100% de las CEpTM.

II) Evaluar la influencia de las MSC de MO de las PCM (n=12, estadio clínico-patológico avanzado, libres de tratamiento y metástasis en MO/ hueso) y VS (n=10) en la regulación de los procesos de proliferación y apoptosis de las CEpTM metastásicas humanas de las líneas MCF-7 y MDA-MB231.

Cuantificación de los niveles de OPG, RANKL y TRAIL en los MC de los cultivos de CFU-F (7 y 14 días) y de MSC del tercer pasaje (día 6 y 12) de MO de PCM y VS por la técnica de ELISA: recordemos que la **OPG** es el receptor soluble de RANKL soluble y de membrana, así como de TRAIL, y es un factor angiogénico; el **RANKL** es un factor que favorece la migración de las CEpTM a hueso y MO, de las MSC al nicho del tumor primitivo y es un factor osteoclastogénico, y el **TRAIL** es un factor apoptótico de osteoclastos en presencia de RANKL y de CEpTM entre otras células. Respecto a la liberación de TRAIL y RANKL fue menor a la dosis mínima detectable en los respectivos ensayos (31,5 pg/ ml), independiente del tipo de cultivo celular y grupo estudiado (PCM y VS).

Los niveles de OPG liberados en los MC de los cultivos de MSC del tercer pasaje (6 y 12 días) de las PCM fueron semejantes al grupo de VS. Los valores ($X \pm ES$, pg/ ml) de OPG fueron: **día 6**, PCM= 868 ± 304 y VS= 1.415 ± 192 ; **día 12**, PCM= 991 ± 344 y VS= 1.269 ± 161 .

Como se sabe cada CFU-F se origina de una MSC, y es definida como una agrupación³ a 50 células y el 85-90% de las células estromales/CFU-F son fusiformes de naturaleza fibroblástica. Del día 3-7 de cultivo se forma la CFU-F y del 10 al 14 se incrementa el tamaño de la colonia es decir se produce la expansión de las células estromales. Los niveles de OPG en los MC provenientes de CFU-F de 7 y 14 días mostraron que la liberación de OPG tanto en el día 7 como en el 14 es significativamente menor en los cultivos

de las PCM y que si bien en ambos grupos la liberación de OPG aumenta significativamente al aumentar la expansión de la colonia, en las PCM este incremento es menor (Figura. 6).

Estudio del efecto de los MC de CFU-F (7 y 14 días) y de MSC (3^{er} pasaje, 12 días) de MO de las PCM y VS sobre la proliferación de las CEpTM por la técnica colorimétrico con azul de tetrazolium (MT): no hubo efecto inductor de la proliferación de las CEpTM de ambas líneas independientemente si los MC fueron usados al 50 o 100% y del tipo de MC usado y grupo evaluado (PCM y VS). Más aún, cuando los MC fueron evaluados al 50% en presencia de 1,25% SBF, tampoco se observó efecto proliferativo sobre las CEpTM de ambas líneas comparado con el efecto estimulante inducido por 1,25 o 2,5% o 5% de SBF. Posiblemente, las CEpTM necesitan una interacción directa con la MSC para modificar su comportamiento o estar en un microambiente específico como es el de MO/hueso.

Estudio del efecto de los MC de CFU-F (7 y 14 días) y de MSC (3^{er} pasaje, 12 días) de MO de las PCM y VS sobre la apoptosis (en presencia o ausencia de 50ng/ml de TRAILrh) de las CEpTM.

Ensayo con anexina V-FITC por citometría de flujo: las CEpTM MDA-MB-231, hormona-independiente, fueron sensibles a 50ng/ml TRAILrh, induciéndose un incremento significativo del % de estas células bajo apoptosis temprana y tardía en comparación con los valores obtenidos de los cultivos no tratados, $p=0,0079$ en ambos casos, por Mann Whitney test (Esquema 1, Figura.7 y Tabla.1).

Por otro lado, ninguno de los tipos de MC mostraron efecto apoptótico directo sobre las CEpTM de esta línea, independiente si eran de PCM o VS. Cabe destacar que hemos observado niveles no cuantificables de TRAIL en estos MC (27) y que estas CEpTM en las condiciones de cultivo para este ensayo liberaron una concentración de OPG mínima que no modificó la acción de 50ng/ml TRAILrh (25) así como tampoco liberaron TRAIL.

Sin embargo, cuando las células MDA-MB231 fueron tratadas con los MC de CFU-F de 14 días de PCM y VS en presencia de TRAIL, el % de células en apoptosis temprana y tardía fue significativamente menor en comparación con el valor del control [50% α -MEM (medio de cultivo de las células de MO) con 20% de SBF calentado 7 días en estufa + 50% DMEM-F12 suplementado (medio de cultivo de las CEpTM con antibiótico-antimicótico) y con el agregado de 10% de SBF + 50 ng/ml de TRAIL] (tabla. 2). Además, los MC de CFU-F de 14 días de PCM mostraron menor capacidad de reducir la acción apoptótica del TRAIL que los MC de CFU-F de 14 días de VS, siendo

este efecto inhibidor del TRAIL significativo en el % de apoptosis temprana (tabla. 2, figuras. 8 y 9). Este menor efecto anti-apoptótico podría estar relacionado a los niveles de OPG significativamente menores encontrados en los MC de PCM respecto a los de VS, resultado comentado anteriormente.

Con respecto al efecto de los MC de CFU-F de 7 días de PCM y VS sobre la apoptosis inducida por TRAIL, no hubo modificaciones probablemente debido a los niveles bajos de OPG cuantificados en estos MC. En contraposición, los MC de MSC de 3° subcultivo (12 días) de PCM y VS, si bien disminuyeron la actividad apoptótica inducida por TRAIL, no presentaron entre ambos diferencias significativas. Resultado, este último, que sería consecuencia directa de los niveles altos y similares de OPG cuantificados en estos MCo.

En referencia a las **CEpTM de la línea MCF-7**, hormona-dependiente, encontramos como otros autores, que las mismas no fueron sensibles a 50 ng/ml de TRAIL. Por otro lado, los MC puros de CFU-F (7 y 14 días) y de MSC de 3° subcultivo (12 días) de PCM y VS no mostraron efecto apoptótico directo sobre MCF-7. Es decir, en estos MC de MO no hay ningún factor que induzca la muerte celular programada en forma directa como se observó también en los resultados presentados con las CEpTM de la línea MDA-MB231, independientemente del tipo y días de cultivo. Como se desprende de los resultados anteriores al agregar TRAIL a estos MC de PCM y VS tampoco hubo inducción de apoptosis.

Ensayo por Tunel: las CEpTM MDA-MB231, hormona-independiente, fueron sensibles a 50 ng/ml de TRAIL, induciéndose la apoptosis de las mismas en comparación con los cultivos no tratados, no así las MCF-7 que fueron no respondedoras al TRAIL al evaluarlas por esta metodología. Por otro lado, los MC puros de CFU-F (7 y 14 días) y de MSC de 3° subcultivo (12 días) de PCM y VS no mostraron efecto apoptótico directo sobre MDA-MB231 y MCF-7. Sin embargo, cuando las células MDA-MB231 fueron tratadas con los MC de CFU-F de 14 días de PCM y VS en presencia de TRAIL, el % de células en apoptosis fue significativamente menor en comparación con el valor del control (50% medio α con 20% de SBF calentado 7 días en estufa + 50% DMEM-F12 basal y con el agregado de 10% de SBF + 50 ng/ml de TRAIL), no encontrándose diferencias entre los valores alcanzados con MC de PCM y VS (ver tabla 3, Figuras. 10 y 11). Un comportamiento semejante tuvieron los MC de las MSC de 3° subcultivo (12 días) de PCM y VS. Por el contrario, los MC de CFU-F de 7 días no presentaron un efecto antagónico sobre TRAIL, independiente de que el MC fuera de PCM o de VS.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados mostraron expresión de OPG en las CEpTM MDA-MB-231 y MCF-7, pero los niveles liberados más altos se cuantificaron en las CEpTM MCF-7. Resultados que coinciden con los de otros autores que encontraron que en tumores primarios con R de estrógeno (E-R) positivos la producción de OPG fue mayor que en los E-R negativos (27, 32). Sin embargo, los niveles de OPG liberados por las CEpTM son muy bajos en comparación con la producción de las MSC de MO (42, 43), lo que hace importante estudiar la participación de las MSC como productoras de OPG. Como se expuso anteriormente, pensamos que las MSC multipotenciales de alta capacidad de clonado y plasticidad posiblemente hayan migrado al tumor primario de mama en los estadios iniciales, por lo cual, utilizamos MSC de MO de VS para evaluar si modifican los procesos de proliferación y apoptosis de ambas líneas y MSC de MO de PCM en estadios avanzados para ver como este reservorio celular como actuaría ante la entrada de CEpTM a MO/hueso. Tanto los MC (día 14) de CFU-F (células estromales mesenquimales) y los MC (día 12) de MSC de MO de las PCM y VS fueron capaces de disminuir la acción apoptótica del TRAILrh sobre las CEpTM MDA-MB-231, no así los MC (día 7) de CFU-F (progenitores hematopoyéticos y bajo n° de MSC y progenitores mesenquimales). Además, los MC de CFU-F de 14 días de PCM mostraron menor capacidad de reducir la acción apoptótica del TRAIL que los MC de CFU-F de 14 días de VS, siendo este efecto inhibidor del TRAIL significativo en el % de apoptosis temprana. Este menor efecto anti-apoptótico podría estar relacionado a los niveles de OPG significativamente menores cuantificados en los MC de PCM respecto a los de VS. Recordemos, que la OPG es inhibidor de RANKL de membrana y soluble, factor osteoclastogénico por excelencia. Resultados recientes de nuestro laboratorio mostraron que las MO de las PCM avanzadas presentaron una deficiente capacidad de diferenciación osteogénica de las MSC, un incremento de la osteoclastogénesis espontánea en sangre periférica y MO, así como una mayor expresión de RANKL membrana/MSC en comparación con las VS (2, 42-44). Todos resultados que refuerzan la hipótesis que la función más importante de las MSC de MO de las PCM avanzado, previo a la aparición de las metástasis ósea, sería la de desregular los procesos de osteogénesis-osteoclastogénesis, a favor de este último, favoreciendo de esta manera la entrada de las CEpTM y el desarrollo del nicho metastásico. Por otro lado, los MC de MO de ambos grupos no tuvieron efecto proliferativo, directo o en presencia de SBF, sobre

las CEpTM de ambas líneas celulares. Posiblemente, las CEpTM necesitan una interacción directa con la MSC de MO para modificar su comportamiento o estar en un microambiente específico como es el de MO/hueso.

Respecto a la liberación de TRAIL y RANKL en los MC de las líneas tumorales y de MO, no se encontró niveles cuantificables. Sin embargo, nuestros ensayos mostraron una expresión positiva para estos factores así como para sus receptores (TRAIL-R1-4 y RANK) en las CEpTM de ambas líneas. No hubo asociación entre la expresión de los TRAIL-R y la resistencia a TRAIL en las CEpTM MCF-7. Respecto a la expresión de RANK en las CEpTM, algunos autores han observado que la misma favorece la migración e invasión de las CEpTM específicamente la MO y hueso (17, 24, 25). Se demostró que la expresión de RANK en la CEpTM del tumor primario, es un marcador predictivo de ocurrencia de metástasis ósea y de un menor período de tiempo de aparición de desórdenes óseos (27, 28). No pudimos cuantificar su ligando soluble pero sí la expresión de RANKLm en las CEpTM de ambas líneas. Brown y col., demostraron que las células que hacen metástasis en MO/ hueso expresan más RANKL que las células que realizan metástasis en otros órganos (45).

SUMMARY

Purpose: over the last years, there has been a high interest in the role of bone marrow (BM) mesenchymal stem cells (MSC) in breast cancer progression. Whether MSC induce or inhibit tumor growth in BM or bone is a field of opposite observations that is related by the complexity of their interaction with breast cancer cells (BCC), other stromal cells, and soluble factors as well as extracellular matrix components that all these cells produce. So, this study was performed to investigate the proliferative and apoptotic effect of the conditioned media (CM) from fibroblast colony forming unit cultures (CFU-F, 7 and 14 days) and MSC-third subcultures (12 days) of BM from untreated advanced BC patients (BCP, without BM/bone metastasis), and healthy volunteers (HV), over two human breast carcinoma cell lines: MDA-MB231 (hormone independent), and MCF-7 (hormone dependent). Moreover, we studied the levels of OPG, RANKL and TRAIL in these CM. Simultaneously, we evaluate these soluble factors and their receptors in BCC of both cell lines.

Methods: cell proliferation was evaluated by MTS assay and cell apoptosis by flow cytometry with Annexin-V and confirmed by TUNEL in rhTRAIL (50ng/ml) presence or not. OPG, RANKL, and TRAIL expression and release,

as well as the expression of their receptors were evaluated by immunofluorescence, immunocytochemistry, western blot and ELISA assays.

Results: data showed that CFU-F (day 14) and MSC-CM, independent the group, had an anti-apoptotic effect on MDA-MB231 when rhTRAIL was added to both CM. Moreover, early apoptosis was significantly higher in cells treated with day 14-CM of BCP-CFU respect to HV-CM ($p=0.0362$), indicating that these BCP-CM presented less OPG as we can measured. We observed that MCF-7 released higher levels of OPG in the CM than MDA-MB231 and 100% of BCC of both lines expressed OPG, RANKL, and TRAIL. Moreover, 100% of BCC expressed membrane RANKL, RANK, TRAIL-R1 and R4, 30-50% TRAIL-R2, and 40-55% TRAIL-R3.

Conclusions: results propose that soluble factors present in the CM did not have a direct effect on BCC, so it seems that may be that BCC need a direct interaction with MSC to modify its behavior. Nevertheless, both type of CM, independent the group, decrease the apoptotic effect of TRAIL over MDA-MB231 and this antagonic effect was lower with CM of BCP CFU-F (14 days) suggesting that BCP-mesenchymal stromal cells cannot increase survival of BCC as do HV-cells. Therefore, the soluble factors released *in-vitro* could differ from those that the patient-stromal cells released when BCC arrive to BM or bone as part of the metastatic process. In the other hand, BCC from MCF-7 and MDA-MB231 only released OPG but expressed RANKL and TRAIL. Also, the major of these BCC expressed membrane RANKL, RANK and TRAIL-R. Therefore, as ligands and receptors evaluated are implicated in the regulation of the proliferation, survival, migration and future bone metastasis during breast tumor-progression, the study of these molecules in tumor-biopsies of BC patients could be useful to identify those patients with more aggressive tumors as well as bone risk, and thus may improve the choices for therapy.

REFERENCIAS

1. Histochem Cell Biol. 130: 1091-1103, 2008.
2. Reserve of MSC in untreated advanced breast and lung cancer patients' bone marrow. Fernández Vallone VB, Martínez LM, Bordenave RH, Chasseing NA. 5th Internacional Conference on Mesenchymal and Non Hematopoietic Stem Cells. Austin, EEUU. Inter Soc for Cellular Therapy. Libro del Congreso abst 47, pg 55, 2009.

3. Spontaneous osteoclastogenesis in bone marrow and peripheral blood of advanced breast cancer patients. Fernández Vallone VB, Otaegui J, Dimase F, Batgelj E, Feldman L, Bordenave RH, Chasseing NA. 5th Internacional Conference on Mesenchymal and Non Hematopoietic Stem Cells. Austin, EEUU. Inter Soc for Cellular Therapy. Libro del Congreso abst 48, pg 57, 2009.
4. CD146+ bone marrow-MSc in advanced stages of untreated lung and breast cancer patients. Fernández Vallone VB, Choi H, Labovsky V, Martínez LM, Bordenave RH; Feldman L, Chasseing NA. MRS-AACR Conference: Metastasis and the Tumor Microenvironment, Philadelphia, EEUU. Book of Program and Proceedings of the Meeting of Metastasis and the Tumor Microenvironment, abst A113, page 85, 2010.
5. Stem Cell Res Ther. 1: 2, 2010.
6. J Biomedicine and Biotechnology 459510. Epub 2011 Jul 24. Wong RS.
7. Oncol Rev. 5: 93-102, 2011.
8. Histol Histopathol 26:941-951, 2011.
9. Exp Cell Res. 315: 3004-3013, 2009.
10. Cancer Metastasis Rev. 29: 249-261, 2010.
11. Bone 48: 37-43, 2011.
12. N Engl J Med. 350: 1655-1664, 2004.
13. N Engl J Med. 353: 793-802, 2005.
14. Biochim Biophys Acta. 1704: 49-57, 2004.
15. Cancer 97: 874-879, 2003.
16. Bull Cancer. 93: 931-943, 2006.
17. Cancer Metastasis Rev. 25: 635-644, 2006.
18. J Surg Res. 100: 18-24, 2001.
19. Biochim Biophys Acta. 1805:17-24, 2010.
20. Clin Transl Oncol. 13: 611-616, 2011.
21. Am J Cancer Res. 1: 787-805, 2011.
22. J Clin Invest . 116: 1195-1201, 2006.
23. Stem Cells 27: 2614-2623, 2009.
24. Nature 440: 692-696, 2006.
25. Histol Histopathol. 24: 235-242, 2009.
26. Oncology. 80: 225-231, 2011.
27. PLoS One. 6(4):e19234, 2011.
28. Clin Breast Cancer. 2011 Jul 15. [Epub ahead of print].
29. Breast Cancer Research Treat. 86: 269-279, 2004.
30. J Clin Pathol. 59: 56-63, 2006.

31. J Biol Chem. 282: 31601-31609, 2007. **32)** J Clin Pathol. 59: 716-720, 2006.
32. J Cell Biochem. 103: 30-41, 2008.
33. Front Biosci 3: 1154-1161, 2011.
34. Apoptosis 2011 Oct 5. McManus S.
35. Cancer 97: 874-879, 2003.
36. J Leukoc Biol. 89: 31-39, 2011.
37. [Clin Cancer Res.](#) 2011 Oct 26. [Dougall WC.](#)
38. Clin Sci (Lond) 110: 279-291, 2006.
39. [Oncol Rep.](#) 21: 1289-1295, 2009.
40. Pancreas 38: 154-160, 2009.
41. MSC and breast tumor cells. Martinez LM, Labovsky V, Fernández Vallone VB, Bordenave RH; Feldman L, Chasseing NA. MRS-AACR Conference: Metastasis and the Tumor Microenvironment, Philadelphia, EEUU. Book of Program and Proceedings of the Meeting of Metastasis and the Tumor Microenvironment, abstract A114, page 86, 2010.
42. Osteoclastogenesis process in bone marrow of untreated advanced breast cancer patients. Fernández Vallone VB, Choi H, Martinez LM, Labovsky V, Batagelj E, Dimase F, Feldman L, Bordenave RH; Chasseing NA. MRS-AACR Conference: Metastasis and the Tumor Microenvironment, Philadelphia, EEUU. Book of Program and Proceedings of the Meeting of Metastasis and the Tumor Microenvironment, abstract B34, page 105, 2010. **44)** Plasticity of mesenchymal stem cells from bone marrow of patients with lung and breast cancer. Hofer EL, Fernández Vallone VB, Labovsky V, Feldman L, Bordenave RH, LaRussa V, Chasseing NA. 5th Internacional Conference on Mesenchymal and Non Hematopoietic Stem Cells. Austin, TX, EEUU. Inter Soc for Cellular Therapy. Libro del Congreso abst 23, pg 30, 2009. **45)** J Cell Physiol. 21: 117-125, 2008.

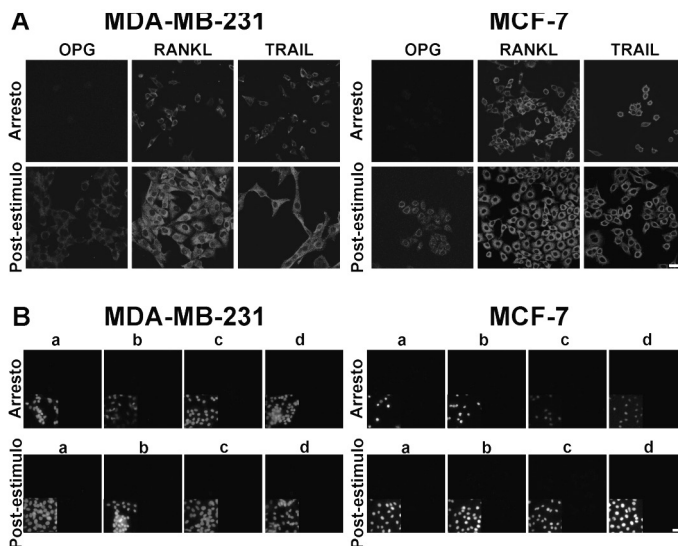


Figura. 1: A) Estudio de la expresión de OPG, RANKL y TRAIL en los cultivos de las CEpTM metastásicas de las líneas MCF-7 y MDA-MB-231, en condiciones de arresto y post-estimulo con 10% de SBF, 48hs, por la técnica de Inmunofluorescencia. Barra de escala representa 30um. **B)** Controles donde se incubaron las CEpTM de las líneas MDA- MB 231 y MCF-7 sin el 1^{er} Ac y con los Acs 2^{rios} hechos en: **a)**- Ac de cabra anti-IgG de ratón marcado con Cy3 (absorbe en el espectro rojo) y **b)**- Ac de cabra anti- IgG de conejo marcado con FICT (absorbe en el espectro verde). Paralelamente, se realizaron otros tres controles **c)**- Ac monoclonal de isotipo IgG1 (Control de DAKO, catálogo= X0931, Ac monoclonal de ratón anti Aspergillus Níger de tipo IgG1), **d)**- Igs totales de ratón (Control de isotipos de ZYMED, catálogo=08-6599) y **e)**- Igs totales de conejo (DAKO, catálogo= X0936). Para los controles **c** y **d** se incubó para revelar con Ac secundario de cabra anti- IgG de ratón marcado con Cy3 (rojo) y para el último control (**e**) con anti- IgG de conejo marcado con FITC (verde). En el inserto se observa la tinción con DAPI de los núcleos celulares. Barra de escala representa 30um.

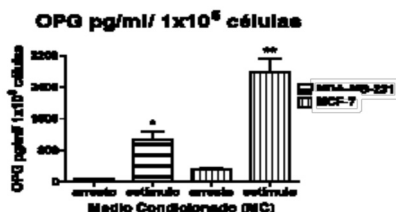


Figura. 2: Estudio de la liberación de OPG en los MC de los cultivos de las CEpTM metastásicas de las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 en condiciones de arresto y post-estimulo con 10% de SBF, 48hs, por la técnica de ELISA. Valores expresados: X + ES (pg/ml/1x10⁶células). Valores de Post-estimulo vs. arresto: MDA-MB-231: * p= 0,0158 y MCF-7: **p= 0,0056 (*test no apareado de Student con corrección de Welch*).

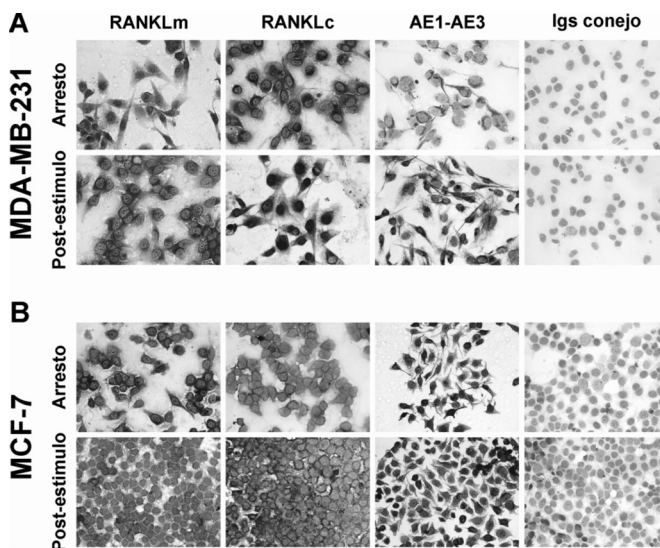


Figura. 3: Expresión de RANKL membrana (RANKLm) en el cultivo CEpTM metastásicas de las líneas MDA-MB231 y MCF-7 cultivadas en condiciones de arresto y post-estimulo, 48 hs, por la técnica de Inmunocitoquímica. Se realizaron controles positivos con Acs anti-RANKL (identificar RANKL citoplasmático evaluado anteriormente) y anti-citoqueratinas de bajo peso molecular (AE1AE3), así como un control negativo utilizando Igs totales de conejo (400X).

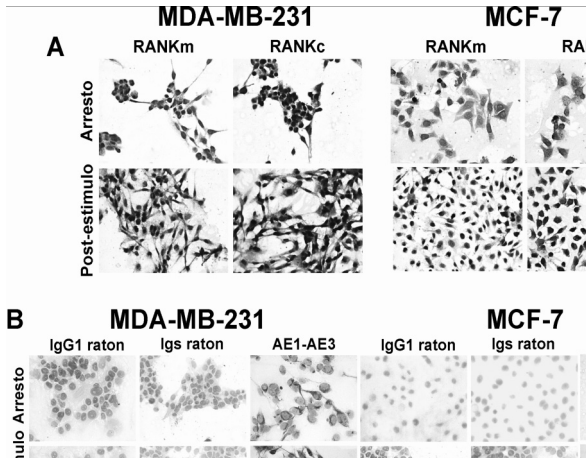


Figura. 4: Expresión de RANK en el cultivo CEpTM metastásicas de las líneas MDA-MB231 y MCF-7 cultivadas en condiciones de arresto y post-estimulo, 48 hs, por la técnica de Inmunocitoquímica. Se realizaron controles positivos con Acs anti-RANK (identificar RANK citoplasmático evaluado anteriormente) y anti-citoqueratinas de bajo peso molecular (AE1AE3), así como un control negativo de isotipo utilizando IgG1 e Igs normal de ratón (400X).

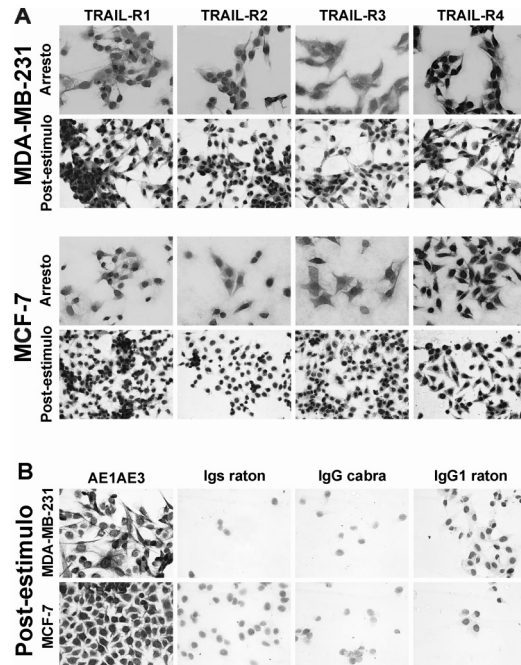


Figura. 5: Expresión de TRAIL-R (R1-4) en el cultivo CEpTM metastásicas de las líneas MDA-MB231 y MCF-7 cultivadas en condiciones de arresto y post-estimulo, 48 hs, por la técnica de Inmunocitoquímica. Se realizaron controles positivos con anti-citoqueratinas de bajo peso molecular (AE1AE3), así como un control negativo de isotipo utilizando IgG1 e Igs normal de ratón , así como Igs normal de cabra (400X).

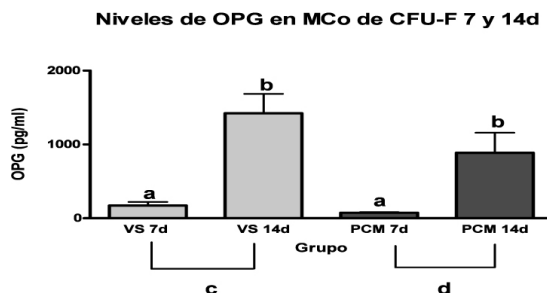


Figura. 6: Niveles de OPG en los medios condicionados (MCo) provenientes de CFU-F de MO de PCM y VS. Los valores están expresados en pg/ml como X + ES. Análisis estadístico: no paramétrico Mann Whitney Test con $p=0,036$ (a); $p=0,048$ (b); $p=0,0001$ (c) y $p=0,001$ (d).

Esquema. 1: esquema explicativo de la lectura de apoptosis por la metodología de Anexina V- Ioduro de Propidio (IP) por citometría de Flujo

- 1- % de CEpTM viables o sin apoptosis medible: Anexina - y IP -
- 2- % de CEpTM en apoptosis temprana: Anexina + y IP -
- 3- % de CEpTM en apoptosis tardía: Anexina + y IP +
- 4- % de CEpTM necróticas: Anexina - y IP +

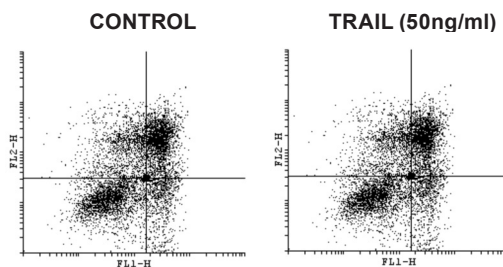
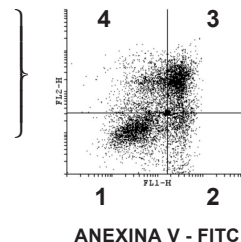


Figura. 7: Acción de TRAIL sobre CEpTM –MDA-MB231 con Anexina V-FIT por Cito-metría de Flujo.

Tabla 1: Efecto del TRAIL sobre los cultivos celulares de MDA-MB231.

	% CELULAS EN APOPTOSIS CON DMEM-F12+alphaMEM+TRAIL			% CELULAS EN APOPTOSIS CON DMEM-F12+alphaMEM (Control Negativo)		
	Temprana	Tardía	Total	Temprana	Tardía	Total
Media	18,34	33,33	51,67	4,156	7,030	11,19
DS	5,034	8,799	11,77	1,932	3,622	5,109
ES	2,251	3,935	5,262	0,8640	1,620	2,285
N	5	5	5	5	5	5

Tabla 2: Efecto de los MC de CFU-F de 14 días de PCM y VS sobre la apoptosis de CEpTM MDA-MB231 inducida con TRAIL.

Tratamientos	% de células MDA-MB231	
	Apoptosis temprana	Apoptosis tardía
MC de PCM + TRAIL	5,662 ± 1,075	10,760 ± 3,171
MC de VS + TRAIL	1,557 ± 1,299	8,687 ± 4,977
TRAIL	14,180 ± 2,665	26,300 ± 4,799

Valores expresados como $X \pm ES$. Análisis estadístico por Test Student, no apareado. % de células en apoptosis temprana: MC- PCM + TRAIL vs. TRAIL: $p=0,0113$; MC-VS + TRAIL vs. TRAIL: $p=0,0015$ y MC-PCM + TRAIL vs. MC-VS + TRAIL: $p=0,0351$. % de CEpTM en apoptosis tardía: MC-PCM + TRAIL vs. TRAIL: $p=0,0180$ y MC-VS + TRAIL vs. TRAIL: $p=0,0339$. Al porcentaje de células en apoptosis temprana y tardía de cada MC se le restó el valor de su respectivo control. Igual se procedió con el control positivo con TRAIL.

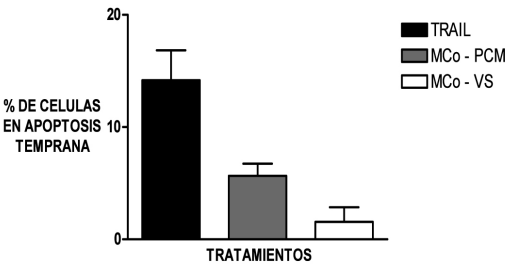


Figura. 8: Comparación del efecto antagónico de los MC de CFU-F de 14 días de PCM vs. VS sobre el % de CEpTM MDA-MB231 en apoptosis temprana inducida con TRAIL. Valores expresados como X + ES. Al % de células en apoptosis temprana de cada medio condicionado (MCo) se le restó el valor de su respectivo control. Igual se procedió con el control positivo con TRAIL. Análisis estadístico: Test “t” Student, no apareado, MC de PCM + TRAIL vs. MC de VS + TRAIL: p=0,0351.

Figura. 9: Ejemplificación del efecto de los MC de CFU-F de 14 días de un PCM y un VS sobre las CEpTM MDA-MB231. Después de 24 hs de adherencia, 48 hs de arresto sin SBF, las células fueron incubadas por 24 hs con: 50% α -MEM con 20% de SBF calentado 7 días en estufa + 50% DMEM/F12 suplementado + 5 % de SBF, con y sin 50 ng/ml de TRAIL; así como con 50% de MC de CFU-F de 14 días de un PCM y un VS + 50% DMEM/F12 suplementado + 5 % FBS, con 50 ng/ml TRAIL. Las células fueron incubadas con Anexina V-FITC y IP. Los gráficos muestran el % de células viables (1, Anexina V-FITC y IP negativos), % de células en apoptosis temprana (2, Anexina V-FITC positivo y IP negativo) y % de células en apoptosis tardía (3, Anexina V-FITC y IP positivos).

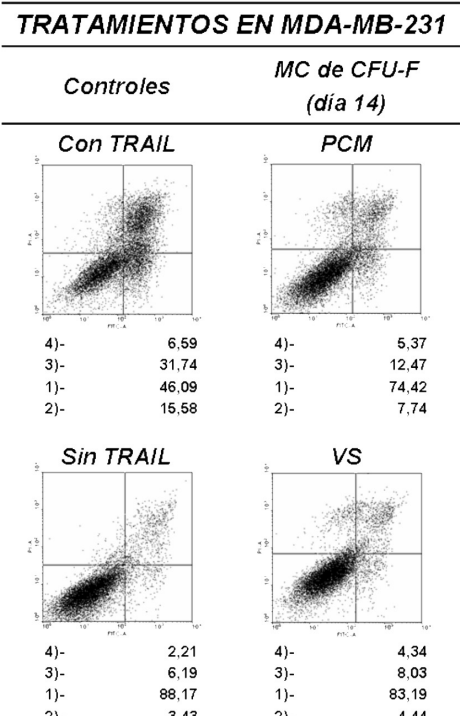


Tabla. 3: efecto de los MC de los cultivos de CFU-F (14 días) de PCM y VS sobre la apoptosis total de la MDA-MB 231 inducidas con TRAIL. Valores expresados como $X \pm ES$. Análisis estadístico: prueba de "t" test no pareada con corrección de Welch: MC-PCM+ TRAIL vs TRAIL: $p = 0,0310$ y MC-VS + TRAIL vs TRAIL: $p = 0,0270$. Al porcentaje de células en apoptosis total post-tratamiento con MC +TRAIL se le sustrajo el valor del control respectivo y la media de los valores individuales se comparó a la media del valor correspondiente al control positivo.

<i>Tratamiento</i>	<i>% apoptosis total de MDA-MB 231 cells</i>
MC-PCM + TRAIL	0,440 $\pm$ 0,071
MC-VS + TRAIL	0,405 $\pm$ 0,072
TRAIL	1,338 $\pm$ 0,312

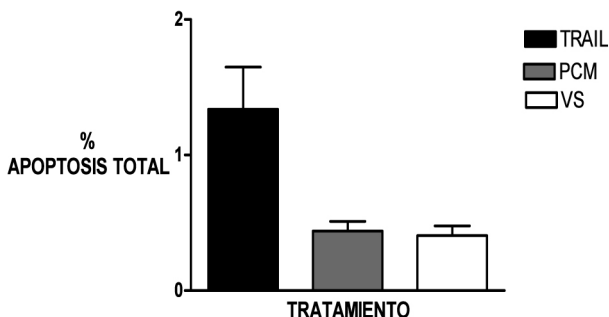


Figura. 10: comparación del efecto antagónico del TRAIL ejercido por los MC de CFU-F (14 días) de las PCM en comparación al efecto inducido por los MC de las VS, expresado como el % de CEpTM MDA-MB 231 en apoptosis. Valores expresados como $X + ES$. Análisis estadístico: Test "t" Student, no pareada, con corrección de Welch: MC- PCM + TRAIL vs TRAIL: $p = 0,0310$ y MC-VS + TRAIL vs TRAIL: $p = 0,0270$. El porcentaje de células en apoptosis total post-tratamiento con MC +TRAIL se le sustrajo a su valor de control respectivo.

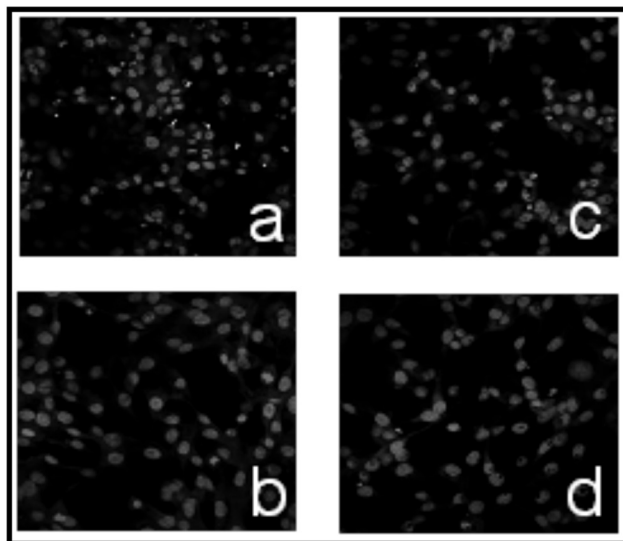


Figura. 11: ejemplo del efecto de un MC de 14 días del cultivo de CFU-F de un PCM y VS sobre la apoptosis de MDA-MB 231 tratadas con TRAIL. Después de 24 hs de adherencia, 48 hs de arresto sin SBF, los cultivos fueron tratados durante 24 hs con: **a-b:** 50% medio a con 20% de SBF calentado 7 días en estufa + 50% DMEM-F12 basal conteniendo 10% de SFB, con y sin 50ng/ml rhTRAIL, respectivamente; **c-d:** 50% de los MC de 14 días del cultivo de CFU-F de un PCM y de un VS, respectivamente + 50% DMEM-F12 basal conteniendo 10% de SFB, con 50ng/ml rhTRAIL. Las células fueron teñidas con Ioduro de Propidio y analizadas con un microscopio confocal (40X). Las imágenes mostraron células apoptóticas en verde (fluoresceína-12-dUTP a 520 ± 20 nm) y células viables en rojo (PI a > 620 nm).



IMPLICANCIAS DEL GEN EMR1 EN LA FUNCIÓN OVÁRICA

Ianina Ferder, Violeta A. Chiauuzi Fernanda Parboreli, Eduardo H.
Charreau, Marta Tesone, Liliana Dain.
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)

La falla ovárica prematura (FOP) se caracteriza por amenorrea primaria o secundaria antes de los 40 años, hipoestrogenismo e hipergonadotropismo con distintos grados de atresia folicular¹. Es un síndrome muy heterogéneo de patogénesis multicausal tales como alteraciones cromosómicas, enzimáticas, autoinmunidad, causas iatrogénicas e infecciosas, que afecta al 1% de las mujeres en edad fértil^{2,3}. Debido a la presencia de varios casos de FOP en una misma familia, se ha sugerido que este síndrome podría ser de origen genético^{4,5}. En algunos estudios, se ha descrito la presencia de mutaciones en genes relacionados con proteínas involucradas en la función ovárica, entre ellos el receptor de FSH^{6,7} y el gen de la subunidad α de la Inhibina^{8,9}. Sin embargo, en trabajos realizados analizando estos genes en diferentes poblaciones incluyendo resultados obtenidos en nuestro laboratorio— no se ha podido demostrar la presencia de mutaciones en pacientes afectadas por FOP o un aumento del riesgo de desarrollar la patología al analizar la presencia de variantes polimórficas^{10–18}. La presencia de mutaciones en casos aislados de FOP, no sólo para los genes ya mencionados sino que también para otros analizados^{19–21}, estaría indicando que probablemente la FOP es una enfermedad muy heterogénea en lo que a variantes genéticas involucradas se refiere. Numerosos trabajos en bibliografía mencionan una asociación entre el estado de premutación (amplificación de tripletes CGG entre 50/55 y 200 repeticiones) en el gen FMR1 (causante del síndrome de Fragilidad del X) y la aparición de FOP^{22–24}. Aproximadamente entre el 10 y el 20% de las madres premutadas de niños con SFX desarrollan FOP²⁵. Por otro lado, la premutación en el gen se ha identificado entre el 0.8% y el 7.5% de mujeres con FOP esporádicas y hasta un 13% en el caso de mujeres con antecedentes familiares de la patología^{25–29}. La prevalencia de la premutación en controles ha sido esti-

mada entre 1/100 y 1/300°. Resultados preliminares de nuestro laboratorio, estarían confirmando estos datos.

Si bien el mecanismo molecular de la patogenia no está dilucidado, el status de premutación *per se* pareciera estar influyendo en la expresión de la enfermedad. De hecho, no se ha descrito que mujeres que poseen expansión completa de tripletes (>200 repeticiones y con signos clínicos de Síndrome de Fragilidad del X) desarrollen FOP36. Si bien no se conoce el mecanismo por el cual la premutación del gen FMR1 puede causar la disfunción ovárica y la falla, ovárica prematura, se ha postulado que puede ocurrir una disminución inicial del número de folículos o una velocidad acelerada de la atresia^{25,37}. Es sabido que la proteína que codifica este gen, FMRP, se expresa en altas cantidades en células germinales del ovario fetal^{38,39}. Asimismo, se ha descrito esta proteína actúa como inhibidor de la traducción de otros ARN mensajeros. Por lo tanto, se ha postulado que un aumento de FMRP en estadios del desarrollo de los ovocitos podría conducir a una haploinsuficiencia de proteínas involucradas en este proceso, provocando una disminución del pool inicial de folículos³⁷. Dado que en FXTAS se ha observado un aumento del ARN mensajero del gen como consecuencia de la premutación⁴¹, un mecanismo alternativo podría ser que hubiera asimismo un aumento del ARN mensajero en el ovario que ejerza un efecto tóxico en el tiempo, con el consecuente incremento de la atresia folicular³⁷. Ninguno de estos mecanismos ha sido aún comprobado en el ovario, más aún la función fisiológica de la proteína en el mismo no está establecida. No se conoce además, si existe expresión diferencial a lo largo del desarrollo folicular. Resultados preliminares de nuestro grupo de trabajo, estudiando el desarrollo folicular en un modelo de rata, estarían indicando folículos preantrales expresan niveles más bajos de la proteína, y que la expresión aumenta a medida que el folículo se desarrolla (folículos antrales tempranos y preovulatorios)⁴². Asimismo, los tipos celulares en los cuales se expresa la proteína son diferentes, de acuerdo al estadio del cual se trate⁴³. Por otra parte, se han descrito distintas isoformas debidas a splicing alternativo del gen⁴⁴, sin embargo, no se conocen cuáles son las que se expresan en el ovario.

El objetivo del proyecto es completar los estudios de la expresión de la proteína y estudiar la expresión del ARN mensajero de FMRP y de sus posibles variantes de splicing en un modelo de desarrollo folicular en rata.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Para el estudio se utilizó un modelo experimental de foliculogénesis a ratas prepúberes de 18 días; b—ratas que al destete fueron inyectadas con una solución de DES (dietilestilbestrol 1 mg/rata) por 3 días, con el objetivo de obtener ejemplares con ovarios enriquecidos en folículos antrales tempranos; c-ratas superovuladas con una dosis única de 25 UI/rata. Las ratas son de la cepa Sprague—Dowley, y son mantenidas en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental.

Western blot

Se obtuvieron folículos aislados en un buffer conteniendo inhibidores de proteasas, los cuales se homogeneizaron y centrifugaron a 15000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante se ultracentrifugó a 150000 x g durante 1 hora para obtener la fracción ribosomal en la cual se encuentra FMRP. Se utilizó el anticuerpo monoclonal específico 1 C3 (Mouse anti—fragile mental retardation protein monoclonal antibody, Millipore) y un segundo anticuerpo conjugado a peroxidasa. Asimismo, se estudió el tejido testicular como control.

PCR en Tiempo Real

Se aisló ARN a partir de ovarios provenientes de ratas con los diferentes tratamientos (entre 3 y 4 ratas por grupo) y se realizó una reacción de retro-transcripción para obtener ADNc a partir de 1 µg de ARN. La cuantificación del gen se hizo mediante una PCR en tiempo real con SYBR Green y *primers* específicos para una zona del gen que no sufre splicing. Como gen *house-keeping* se utilizó el gen ribosomal 18S.

RT—PCR

Se sintetizó ADNc a partir de ARN extraído de ovario y otros tejidos de rata y se utilizaron sets de primers dirigidos contra diferentes exones del gen”:

— Set 1: Dirigido para amplificarlos exones 11, 12 y 13 y ver posible splicing del exón 12. — Set 2: Dirigido contra los exones 14 y 15 para ver isoformas debidas al splicing del 15.

— Set 3: Contra exones 15 y 17 para posible splicing del 17.

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa o poliacrilamida teñidos con bromuro de etidio. Las diferentes isoformas obtenidas se extrajeron de los geles de agarosa, se purificaron por columnas del tipo OFX y enviaron a secuenciar a modo de confirmación de los resultados obtenidos.

Debido a la dificultad que se presentó a la hora de separar del gel las isoformas obtenidas con el set I de *primers*, las mismas no pudieron ser secuenciadas luego de la purificación ya que presentaban contaminación con las bandas restantes, por lo que las diferentes especies de ARN fueron clonadas utilizando un kit comercial (TOPO TA Cloning, Invitrogen) y los plásmidos obtenidos se enviaron a secuenciar.

RESULTADOS

La figura 1 muestra un Western Blot representativo en el cual se puede observar la expresión diferencial de FMRP en los diferentes estadios del desarrollo folicular. Se consigna también la expresión de la proteína actina (control de carga) y otra proteína ribosomal (S6).

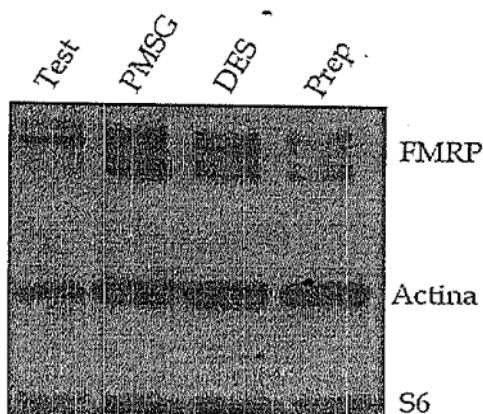


Figura 1. Western Blot con extractos de distintos estadios foliculares de rata y tejido testicular. En todas las calles se sembraron 12µg de proteína excepto en Test en la cual se sembraron 5µg. Test: testículo de rata; PMSG: ratas tratadas con PMSG; DES: ratas tratadas con DES; Prep: ratas prepúberes sin tratamiento. Actina: control de carga; S6: proteína ribosomal

La Figura 2 muestra un gráfico representativo de una corrida por PCR en tiempo real de los estadios foliculares en estudio. De acuerdo a lo observado en este experimento, la expresión del mensajero de FMR1 sería similar en todos los estadios del desarrollo.

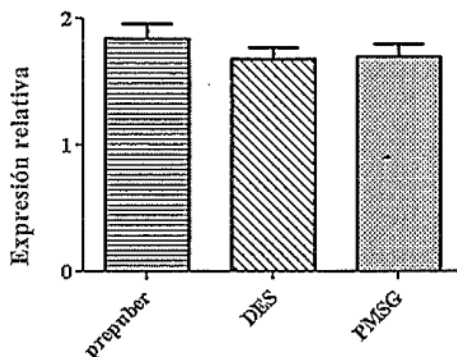


Figura 2. Análisis de la expresión del ARNm de FMR1 en ovarios en los distintos estadios del desarrollo folicular. Prepúber: ratas prepúberes; DES: ratas DES; PMSG: ratas PMSG

La Figura 3 muestra electroforesis representativas del estudio por RT-PCR de la expresión de las distintas variantes de splicing del gen en ovario y en otros tejidos de rata utilizados como control.

La amplificación del fragmento conteniendo los exones 11, 12 y 13 (set 1) reveló la presencia de 2 bandas específicas correspondientes a los 2 productos generados por splicing del exon 12 (Figura 3A). La identidad de estas bandas, al igual que la observada en la Figura 3C, fue corroborada por secuenciación (datos no mostrados)— A su vez se pudo observar que la expresión de cada una de dichas isoformas varía según el tejido analizado. Asimismo se observaron distintas isoformas al utilizar los *primers* dirigidos contra los exones 14 y 15 (Figura 3B). Estamos a la espera de los resultados de la secuenciación de las mismas. La amplificación de los exones 15, 16 y 17 (set 3) mostró una única banda, lo cual estaría indicando que, al menos en la zona amplificada por el set de *primers* utilizado, no ocurre splicing del exon 17 (Figura 3C).

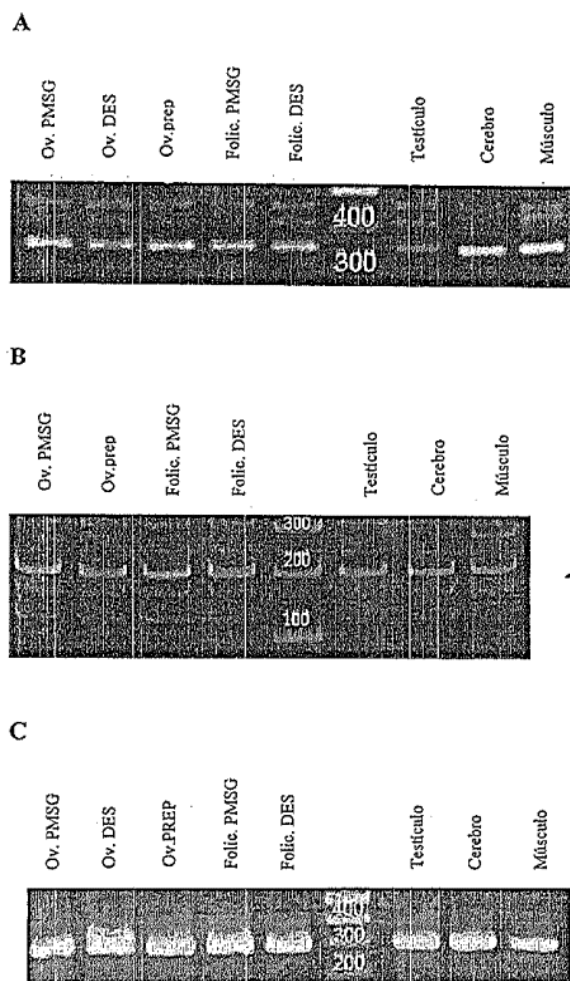


Figura 3: RT-PCR utilizando los 3 sets de primers. Ov.: Ovario; Folic.: Folículos. A: Resultados obtenidos utilizando el set 1; B: set 2 y C: set 3.

DISCUSIÓN

La proteína FMRP se encuentra asociada a polirribosomas en forma ARNdependiente formando parte de partículas mensajero-ribonucleoproteicas (mRNP). Se ha propuesto que la proteína estaría influenciando la plasticidad sináptica a través de su función como transportadora de ARN y reguladora de la traducción. Más recientemente, se ha sugerido que FMRP estaría relacionada con los mecanismos de inhibición de la traducción mediados por microARNs⁴⁵.

Si bien su función está muy estudiada a nivel del sistema nervioso, su participación en el ovario no ha sido estudiada hasta el presente. Tampoco se ha descrito, si la proteína se expresa en forma diferencial a lo largo del desarrollo folicular. Dado que el gen FMR1 estaría implicado en el desarrollo de la FOP, es necesario dilucidar cuál puede ser la función normal del gen en el ovario.

En trabajos previos de nuestro laboratorio pudimos observar una expresión diferencial de la proteína FMRP a lo largo del desarrollo folicular en el ovario de rata. La expresión es baja en los estadios menos avanzados y aumenta a medida que el ovario se desarrolla.

En esta segunda parte del trabajo quisimos ver si dicha expresión diferencial de la proteína se correlacionaba con una expresión variable del ARN mensajero. La expresión de la proteína fue estudiada por Western Blot, hallándose, al igual que lo reportado en forma preliminar anteriormente⁴², que la expresión es menor en folículos preantrales y aumenta a medida que el folículo se desarrolla (folículos antrales tempranos y preovulatorios). De la misma manera, se puede afirmar que la expresión diferencial es específica para FMRP ya que no se observó el mismo patrón para la proteína ribosomal S6.

Utilizando el ARN total extraído del tejido ovárico entero, no pudimos observar diferencias en la expresión del mensajero en los distintos estadios. Esto podría deberse al uso del ovario entero que puede presentar folículos en distintos estadios y no al de folículos aislados de un tamaño en particular. Sin embargo, también podría ocurrir que exista una misma cantidad de mensajero en todos los estadios, pero que estos se traduzcan diferencialmente resultando en niveles de proteína variables a lo largo de la foliculogénesis.

Por otro lado, del estudio de las isoformas de splicing, hemos observado la presencia de varias variantes en el ovario de rata. Hasta la fecha, sólo se ha reportado en rata la expresión de FMRP a nivel de cerebro^{46,47}, y en dicho tejido no se expresa la variante conteniendo el exón 12. Estos

resultados cobran importancia si se tiene en cuenta que las diferentes isoformas podrían variar en sus propiedades como ser unión al ARN, localización nuclear y modificaciones posttraduccionales, que podrían implicar funciones diferenciales y específicas de tejido para el gen FMR1. De hecho, observamos expresión diferencial en la cantidad de alguna de las isoformas dependiendo del tejido en estudio. Nuevamente, estas diferencias podrían estar indicando funciones del gen tejido-específicas.

En conclusión, hemos hallado que la proteína se expresa de manera diferencial a lo largo del desarrollo folicular, si bien hasta ahora no hemos podido demostrar que esta expresión se correlacione con los niveles de ARN mensajero que se expresa. Asimismo, hemos evidenciado la presencia de distintas isoformas del ARN mensajero, lo que podría sugerir alguna funcionalidad especial del gen en el tejido ovárico.

RESUMEN

La falla ovárica prematura (FOP) se caracteriza por amenorrea primaria o secundaria antes de los 40 años, hipogonadismo e hipergonadotropismo. Es un síndrome heterogéneo, multicausal, que afecta al 1% de la población en edad fértil. Se ha descrito que existiría una asociación entre el estado de premutación (amplificación de tripletes CGG entre 55 y 200 repeticiones) en el gen FMR1 (causal del Síndrome de Fragilidad del X) y el desarrollo de FOP.

Si bien es sabido que la proteína FMR1 se expresa en el ovario, su función en el mismo no está establecida. No se conoce además, si existe expresión diferencial a lo largo del desarrollo folicular. El objetivo general del proyecto es estudiar el rol del gen FMR1 en la función ovárica.

En trabajos previos de nuestro laboratorio encontramos que la proteína FMRP se expresa diferencialmente en folículos en distintos estadios del desarrollo. Para continuar con los estudios acerca de la expresión del gen, en esta segunda parte estudiamos la expresión del ARN mensajero y las isoformas de splicing presentes en el ovario, utilizando el mismo modelo animal. Para el modelo de foliculogénesis se utilizaron ratas Sprague-Dowley prepúberes (18 días) así como ratas que al destete fueron inyectadas con una solución de DES (dietilestilbestrol 1mg/rata) por 3 días, o bien superovuladas con una dosis única de 25 UI/rata de gonadotrofinas PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin). La expresión del mensajero se estudió por PCR en tiempo real y la caracterización de las isoformas se realizó mediante RT-PCR seguida de la purificación y secuenciación. Observamos que la expresión del ARN no varía en ovarios de ratas en distintos estadios del desarrollo folicular.

Por otra parte, se evidenció la presencia de varias isoformas del mensajero como resultado del splicing alternativo del exon 12 y del exón 15.

SUMMARY

Premature Ovarian Failure (POF) is characterized by the cesation of gonadal function before 40 years of age, hypoestrogenism, elevated gonadotrophin serum levels, and different stages of follicular atresia. POF is a very heterogeneous syndrome with multicausal pathogenesis affecting 1% of women in reproductive age. Specific genetic alterations or mutations are already identified in some genes as responsible for cases of POF, though in more than 90 % of patients the aetiology of the disease is still unknown. Previous reports, however, indicate an incidence close to 4% of FMR1 –premutation carriers among POF patients. Moreover, close to 20% of the permuted mothers of Fragile–(X) children develop POF. The product of FMR1 gene, FMRP, is expressed in a wide range of tissues including the ovary, though its function in this gonad has not been elucidated, nor its expression during follicular development. The aim of our study is to study the influence of FMR1 in the ovarian function by the aid of a rat model.

In previous studies we found that FMRP is differentially expressed during follicular development. In this second part of the project we focused our work on the expression of mRNA and its putative isoforms generated by alternative splicing.

Ovaries were removed from female Sprague–Dawley prepuberal rats or from 23 days–old rats that were injected subcutaneously with diethylstilbestrol (DES: 1 mg/rat daily for three days) to stimulate the development of early antral follicles. Alternatively, 23 days–old rats were injected with PMSG (25 UI/rat) to stimulate the development of preovulatory follicles. Levels of RNA expression were analysed by Real Time PCR and RT–PCR followed by sequencing was used to assess the isoforms present in the gonad.

Real Time PCR analyses disclose a similar expression of mRNA in ovaries from the 3 groups of rats and RT–PCR studies revealed several isoforms of the gene resulting from alternative splicing of exons 12 and 15.



DIETA RICA EN HIDRATOS DE CARBONO SIMPLES DURANTE LA PREÑEZ, LA LACTANCIA Y LA POST LACTANCIA. EFECTO SOBRE ASPECTOS DEL METABOLISMO LIPÍDICO E HIDROCARBONATO EN LA DESCENDENCIA.

Chicco A, Lombardo Y

Departamento de Ciencias Biológicas. Laboratorio de estudio de enfermedades metabólicas relacionadas con la nutrición. Cátedra de Química Biológica- Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

SÍNTESIS DEL INFORME FINAL

El tipo de macronutrientes ingeridos durante los primeros estadios de la vida ejercen su impacto en el desarrollo de las enfermedades metabólicas del adulto tales como obesidad, diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares e hipertensión, todas incluidas en Síndrome Plurimetabólico (1-5). Diferentes estudios han demostrado que tanto una pobre nutrición materna durante la preñez y la lactancia –dieta hipocalórica o con baja calidad proteica- como una nutrición rica en grasas predisponen a la descendencia a obesidad, dislipidemia, intolerancia a la glucosa (6,7). De forma similar, en el humano se observa que hijos de madres obesas o con diabetes gestacional durante el embarazo, presentan una alta incidencia de obesidad y de diabetes tipo 2 tanto en la niñez como en la vida adulta (8). En su conjunto, estos estudios demuestran que intervenciones nutricionales con el objeto de modificar la composición de la dieta materna durante la preñez y la lactancia podrían ser efectivas para reducir el riesgo de obesidad y enfermedades metabólicas en las generaciones siguientes.

En las últimas décadas incrementó considerablemente el consumo de hidratos de carbono simple (sacarosa y/o fructosa), debido principalmente a la utilización de jarabe de fructosa en la preparación de bebidas analcohólicas y de diferentes productos alimenticios. Si bien es conocido que un alto contenido de estos azúcares administrados en las dietas tanto en el hombre como en animales de experimentación en su etapa adulta, conducen a dislipidemia e intolerancia a la glucosa (9-11), menos se conoce el efecto que las mismas dietas, ingeridas por las madres en la etapa de preñez y lactancia, pueden ejercer sobre su descendencia y la relación de las mismas con la dieta post-destete.

De lo expuesto, nos propusimos analizar en un modelo no genético de ratas Wistar:

Si las crías de madres alimentadas con dieta rica en sacarosa durante la preñez y la lactancia están predispuestas a desarrollar alteraciones en el metabolismo lipídico e hidrocarbonato cuando son alimentadas post destete con dieta control.

Si las crías de las madres alimentadas con dieta rica en sacarosa continúan en el post destete con la misma dieta (es decir, sufren el mismo tipo de injuria durante el desarrollo y los estadios primarios de la vida) presentan o no una mayor alteración del metabolismo lipídico e hidrocarbonato comparando con las crías alimentadas con dieta rica en sacarosa post-destete provenientes de madres con dieta control durante la preñez y la lactancia.

Ratas hembras (200-230 gramos) fueron apareadas con un machos. Previo y durante el período de apareamiento los animales fueron alimentados con dieta comercial (pellet). El día de lapreñez (uno de gestación) las hembras fueron transferidas a jaulas individuales y alimentadas con una de las siguientes dietas:

Grupo DC: animales alimentados con dieta control (DC): fuente de hidratos de carbono: almidón 62.5% (p/p).

Grupo DRS: animales alimentados con dieta rica en sacarosa (DRS): fuente de hidratos de carbono: sacarosa 62.5% (p/p).

El resto de los componentes de ambas dietas es el recomendado por el Comité ad Hoc del Instituto Americano de Nutrición. Las dietas son isoenergéticas (16.3 kJ/ g de comida), y se administraron "ad limitum". Al nacer, las crías fueron pesadas, reducidas a un número de 8 por madre (en lo posible, igual número de hembras y machos) y mantenidas con sus madres hasta el destete. Al destete las crías machos de cada lote fueron divididas al azar en dos lotes y alimentados con DC o DRS hasta alcanzar los 100 o 150 días de vida. Los grupos se definieron de acuerdo a sus dietas post lactancia como DC-DC, DC-DRS y DRS-DRS, DRS-DC respectivamente. La ingesta calórica y el peso corporal de las crías se determinaron semanalmente. Al final del periodo experimental al menos 6 animales de cada grupo experimental fueron sacrificadas bajo anestesia, se obtuvieron muestras de sangre y de tejidos (hígado, corazón, adiposos epididimal y retroperitoneal) que fueron pesados inmediatamente. El plasma obtenido y el tejido hepático se congelaron inmediatamente a -80°C. En otro grupo de animales de cada lote, se llevaron a cabo las experiencias "in vivo" que se detallan posteriormente.

Los niveles plasmáticos de glucosa, insulina inmunoreactiva, triglicé-

ridos, ácidos grasos libres, colesterol y el contenido de triglicéridos y glucógeno en tejido hepático se determinaron por métodos espectrofotométricos (12-14). En animales ayunados (16-18 hs) se determinó la velocidad de secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-Tg), la velocidad de remoción de una partícula grasa (Intralipid) y el test de tolerancia a la glucosa como se describieran previamente (14). Se utilizó el test de insulina endovenoso para determinar la acción insulínica corporal global en ratas ayunadas durante 5 hs. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. La significación estadística se determinó por el test "t" de Student y cuando fue necesario se utilizó análisis de variancia (ANOVA), con posterior test de Scheffe's. Diferencias con valores de $p < 0.05$ se consideraron significativamente diferentes.

Los resultados alcanzados muestran:

1- Ganancia de Peso e ingesta calórica

Las ratas alimentadas con DRS durante la preñez conducen a una reducción del peso corporal de las crías al nacimiento cuando se las compara con aquellas nacidas de madres alimentadas con DC. Sin embargo a los 21 días de vida –momento del destete- se observa un incremento significativo tanto del peso corporal como de la ganancia de peso en las crías provenientes de madres alimentadas con DRS. No se observó diferencias significativas en el peso corporal, la ingesta calórica ni el peso relativo de los tejidos hepáticos y cardíacos de las crías de cada grupo experimental comparados con los controles erarios. Un patrón diferente se observa a los en el peso relativo del tejido adiposo epididimal y retroperitoneal. Mientras a los 100 días de vida ambos tejidos no muestran diferencias significativas de peso tanto absoluto como relativo, una mayor adiposidad -incremento del peso absoluto y relativo de los tejidos adiposos epididimal y retroperitoneal- puede observarse cuando la DRS está presente en cualquier estadio de vida ($p < 0.05$ DC-DRS, DRS-DRS y DRS-DC vs DC-DC)

2- Niveles de metabolitos e insulina plasmáticos: son descriptos en la Tabla 1.

3- Contenido de triglicéridos hepáticos, secreción de pre-b-lipoproteína (VLDL-Tg) y remoción de una partícula grasa (IVFTT).

Los resultados son descriptos en la Tabla 2.

4- Tolerancia a la glucosa y sensibilidad insulínica

Para analizar el manejo “in vivo” de la glucosa, se administro un simple bolo de glucosa endovenosa. Cuando la sacarosa esta presente en la dieta materna durante la preñez+lactancia y/o en las crías durante el post-destete (DC-DRS, DRS-DRS y DRS-DC) el Kg esta significativamente disminuido ($p<0.05$) comparado con el grupo DC-DC. Sin embargo, el área bajo la curva integrada en los 30 minutos posteriores a la inyección de glucosa fue similar en todos lo grupos experimentales.

La acción insulínica corporal global “in vivo” se determino utilizando el test de tolerancia a la insulina. Cuando la sacarosa está presente en cualquier estadio de vida, las crías presentan una

velocidades de remoción de glucosa del plasma (KITT) disminuido ($p<0.05$ DC-DRS, DRS-DRS y DRS-DC vs DC-DC). Nuevamente, el área bajo la curva integrada durante el test de insulina fue semejante en todos los grupos.

Tabla 1. Niveles plasmáticos de glucosa, insulina, triglicéridos (Tg), ácidos grasos (AGNE) y colesterol en las crías machos de los diferentes grupos experimentales a los 100 y 150 días de vida.¹

GRUPO	Tiempo (días)	Glucosa (mM)	Insulina (μ U/ml)	Tg (mM)	Colesterol (mM)
DC-DC	100	6.37 $\pm$ 0.09 ^c	72.67 $\pm$ 7.20	0.54 $\pm$ 0.03 ^c	2.18 $\pm$ 0.06 ^b
	150	6.35 $\pm$ 0.08 ^c	70.70 $\pm$ 8.21	0.65 $\pm$ 0.03 ^c	2.17 $\pm$ 0.05 ^b
DC-DRS	100	7.65 $\pm$ 0.09 ^a	88.11 $\pm$ 17.32	1.77 $\pm$ 0.14 ^a	2.87 $\pm$ 0.06 ^a
	150	7.70 $\pm$ 0.07 ^a	83.70 $\pm$ 18.0	1.50 $\pm$ 0.18 ^a	2.94 $\pm$ 0.15 ^a
DRS-DRS	100	7.62 $\pm$ 0.10 ^a	88.56 $\pm$ 12.38	1.40 $\pm$ 0.16 ^a	2.46 $\pm$ 0.09 ^{a,b}
	150	7.89 $\pm$ 0.10 ^a	84.90 $\pm$ 13.90	1.60 $\pm$ 0.22 ^a	2.50 $\pm$ 0.08 ^{a,b}
DRS-DC	100	6.93 $\pm$ 0.10 ^b	70.31 $\pm$ 12.38	1.00 $\pm$ 0.07 ^b	2.12 $\pm$ 0.08 ^b
	150	6.95 $\pm$ 0.09 ^b	66.30 $\pm$ 8.70	1.20 $\pm$ 0.11 ^b	2.56 $\pm$ 0.10 ^{a,b}

Tabla 2. Contenido de triglicéridos (Tg) hepáticos, secreción de VLDL-Tg (VSTG) y

¹ Los diferentes parámetros se determinaron en los grupos DC-DC: crías alimentadas con DC provenientes de madres alimentadas con DC durante la preñez + lactancia; DC-DRS: crías alimentadas con DRS provenientes de madres alimentadas con DC durante la preñez + lactancia; DRS-DRS: crías alimentadas con DRS provenientes de madres alimentadas con DRS durante la preñez + lactancia y DRS-DCD: crías alimentadas con DC provenientes de madres alimentadas con DRS durante la preñez + lactancia.como. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. Al menos 8 animales fueron utilizados en cada grupo experimental. Los valores en cada columna que no comparten la misma letra superescrita son significativamente diferentes ($p<0.05$) en sus respectivos tiempos de vida.

remoción de una partícula grasa (IVFTT) en las crías machos de los animales alimentados de los diferentes grupos experimentales a los 100 días (3A) y 150 días (3B) de vida.¹

GRUPO	Tiempo (días)	Tg hepáticos (mmol/g tej húmedo)	VSTG	IVTT K2% min ⁻¹
DC-DC	100	9.41 ± 0.78 ^c	149.10 ± 7.51 ^b	9.71 ± 0.53 ^a
	150	8.72 ± 0.56 ^c	151.25 ± 8.22 ^c	8.90 ± 0.49 ^a
DC-DRS	100	20.92 ± 1.05 ^a	216.85 ± 9.73 ^a	5.57 ± 0.32 ^b
	150	19.28 ± 1.20 ^a	229.30 ± 10.12 ^a	5.38 ± 0.29 ^b
DRS-DRS	100	18.35 ± 1.70 ^a	262.10 ± 11.35 ^a	5.87 ± 0.38 ^b
	150	17.90 ± 1.55 ^a	238.21 ± 12.40 ^a	6.34 ± 0.49 ^b
DRS-DC	100	12.61 ± 0.98 ^b	143.12 ± 6.21 ^a	5.51 ± 0.47 ^b
	150	12.40 ± 1.00 ^b	184.12 ± 8.51 ^b	5.50 ± 0.61 ^b

En su conjunto estos datos sugieren que la exposición en períodos tempranos de la vida a la DRS (preñez + lactancia) induce cambios importantes en el metabolismo de los lípidos y la glucosa de las crías en los estadios más tardíos de la vida, independientemente que las mismas consumen la DRS posterior al destete. Más aún no se observa un efecto protector de la ingesta de DRS durante la preñez + lactancia, cuando las crías son expuestas al mismo tipo de injuria post-destete como podría pensarse de acuerdo a la teoría de la respuesta predictiva adaptativa (PARs). Esto enfatiza la importancia de la dieta materna durante la preñez y la lactancia y en las crías en los primeros períodos de vida post-destete que podrían impactar en el largo plazo, conduciendo a una mayor incidencia de enfermedades relacionadas al Síndrome Metabólico. El modelo experimental utilizado sirve además, para implementar estrategias en el área de salud a nivel nutricional que ayuden a mejorar o prevenir el desarrollo de enfermedades crónicas del adulto.

SUMMARY

The present study analyze if offspring of normal Wistar dams fed a high-sucrose diet (SRD) during pregnancy+lactation are predisposed to develop impaired lipid and glucose homeostasis when they are weaned on a control

¹ Los diferentes parámetros se determinaron en los grupos experimentales como se detallo previamente (ver detalle en descripción Tabla 1). Los resultados se expresan como media ± SEM. Al menos 8 animales fueron utilizados en cada grupo experimental. Los valores en cada columna que no comparten la misma letra superescrita son significativamente diferentes (p<0.05) en sus respectivos tiempos de vida.

diet (CD) and if a more pronounced derangement of the above metabolites is present when they are fed the SRD post-weaning compared to offspring from CD-fed dams feeding a SRD since weaning.

During pregnancy+lactation female rats were fed a SRD or a CD. After weaning, males' offspring of both groups were divided into two subgroups and fed respectively CD or SRD until 100 or 150 days of age (CD-CD, CD-SRD, SRD-SRD and SRD-CD groups).

Results showed: Final body weight between groups was similar although pups from SRD-fed dams have lighter body weight at birth. At 150 days adipose tissue weight was significantly higher when sucrose was present at any period of life. Plasma lipids and glucose levels were significantly higher without changes in insulin levels in the CD-SRD, SRD-SRD and SRD-CD groups compared to CD-CD at both period of life. Dyslipidemia was the result of increased VLDL-TAG secretion and decreased triacylglycerol clearance, associated with increased liver triacylglycerol content in CD-SRD and SRD-SRD groups. At 100 days hypertriglyceridemia observed in SRD-CD group was mostly associated with decreased triacylglycerol clearance, since VLDL-triacylglycerol secretion and liver triacylglycerol content were similar to CD-CD. Conversely at 150 days VLDL-triacylglycerol secretion rate was increased in all the groups where sucrose was present. An altered glucose and insulin tolerance was observed when SRD was present at during the pregnancy+lactation and/or post-weaning at both, 100 and 150 days of life.

These data support the hypothesis that early life exposure to SRD is associated with changes in lipid and glucose metabolism that could lead to an unfavorable adulthood profile whether or not pups consumed SRD post-weaning.

REFERENCIAS

1. McMillian IC, Robinsion JS (2005). *Physiological Reviews* 85:571-633.
2. Bouret SG (2009). *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 48: 531-538.
3. Symonds ME, Sebert SP, Hyatt MA, Budge H (2009) *Nature Reviews. Endocrinology* 5: 604-610.
4. Bruce KD, Hanson MA (2010). *J of Nutr* 140: 648-652.
5. Heerwagen MJ, Miller MR, Barbour LA, Fridman JE (2010). *Am J of Physiol Reg, Integ and Comparatative Physiol* 299: R711-R728.

6. Hales CN, Barker DJ (1992) *Diabetologia* 35: 595-601.
7. Painter RC, Roseborn TJ, Blader OL (2005) *Reprod Toxicol* 20: 345-352.
8. Taylor PD, Poston L (2007) *Exp Physiol* 92: 287-398.
9. Elliot SS, Kein NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ (2002) *Am J Clin Nutr* 76: 911-920.
10. Lombardo YB, Chicco A (2006). *J Nutr Biochem* 17: 1-13.
11. Basciano H, Federico L, Adeli K (2005). *Nutr Metab (Lond)* 2:5.
12. Chicco A, D'Alessandro ME, Hein GJ, Oliva ME, Lombardo YB (2008) *Br J Nutr* 20:1-10.
13. Herbert V, Lan KS, Gottlieb CH, Bleicher SJ (1965) *J Clin Endocrinol Metab* 25: 1375-1384.
14. Lombardo YB, Chicco A, D'Alessandro ME, Martinelli M, Soria A, Gutman R (1996) *Biochem Biophys Acta* 1299: 175-17882.



AVANCES EN LA DETECCIÓN DE SINDROME DE CUSHING MANIFIESTO Y SUBCLÍNICO APLICANDO UNA METODOLOGÍA NO INVASIVA: CORTISOL EN SALIVA. PROPUESTA DE UN NUEVO ALGORITMO DIAGNÓSTICO EN PACIENTES ASISTIDOS EN UN HOSPITAL DE LA UBA.

Liliana Noemí Contreras

Departamento de Endocrinología Experimental, Instituto de Investigaciones
Médicas A. Lanari, Universidad de Buenos Aires.

INTRODUCCIÓN

El Síndrome de Cushing subclínico (SCS) es el resultado de una alteración de la secreción hipotálamo-hipofiso-adrenal en ausencia de signos o síntomas clásicos de hipercorticismismo manifiesto, siendo un desafío su diagnóstico(1). Existen evidencias que esta disrupción secretoria conduce a largo plazo al desarrollo de comorbilidades secundarias al exceso de cortisol: diabetes, hipertensión arterial, obesidad, osteoporosis (2,3,4). Estas patologías son altamente frecuentes en la población general y se ha descrito la presencia simultánea de SCS en 1-3% de diabéticos con mal control metabólico, 9,2% de pacientes con tumores adrenales incidentales y 0,5-1,0% de hipertensos, considerándose a estas poblaciones de riesgo (5,6,7,8,9). En la actualidad no existe consenso sobre los criterios clínico-bioquímicos para diagnosticar esta condición utilizándose las determinaciones hormonales recomendadas para el diagnóstico de SC manifiesto (10).

Recientemente se ha propuesto la determinación de cortisol nocturno en saliva en el estudio del hipercorticismismo endógeno. El cortisol en saliva (SAF) refleja la fracción biodisponible del cortisol total circulante que difunde libremente desde los capilares sanguíneos al acino de las glándulas salivales (11). La determinación de SAF en la práctica clínica permite el abordaje no invasivo del paciente en el estudio de la función adrenal.

El objetivo de este trabajo consistió en diagnosticar SCS en una población de riesgo ambulatoria asistida en un Hospital Universitario durante un período de dos años y definir el procedimiento diagnóstico de mayor sensibilidad

SUJETOS Y MÉTODOS

Se estudiaron 100 pacientes (de ambos sexos, edades entre 18-60 años y evolución mayor de 2 años) con los siguientes criterios de inclusión: a) diabéticos tipo1 (DM1; n=10) y diabéticos tipo 2 con mal control metabólico (DM2;n=53); b)tumores adrenales incidentales (IA, n=12); c) individuos con cifras de TA>140/90 mmHg (criterio OMS) y obesidad central (cintura/cadera >0,8 en la mujer y >0,9 en el varón) (HTA; n=10); d)mujeres con hirsutismo (H; n=5) y e) individuos con litiasis renal recurrente de etiología desconocida (LR). Los grupos de referencia estuvieron integrados por 100 voluntarios sanos en edades entre 18-60 años con IMC 24 ± 1.8 kg/m², clearance de creatinina >90,0 ml/min, ausencia de enfermedad endócrina y libres de medicación al momento del estudio (Control) y 21 pacientes con síndrome de Cushing manifiesto (SC). Ningún participante recibía drogas que pudieran alterar la función adrenal o el metabolismo de la dexametasona.

El protocolo fue autorizado por el Comité de Ética del IDIM A Lanari. Todos los participantes dieron su consentimiento por escrito para realizar el protocolo de estudio.

Protocolo del estudio

a) *Estudio del flujo salival*: entre las 8 y las 9, todos los individuos obtuvieron saliva total por emisión espontánea durante 5 minutos en tubos de polipropileno estériles, previamente pesados para calcular el flujo salival que se expresó en ml/min. Una hora antes se enjuagaron la boca con agua corriente para eliminar restos de alimentos y se les indicó evitar toda ingesta oral y fumar hasta haber completado el estudio. Todos los sujetos presentaron flujo salival en el rango de normalidad (0,40-1,3 ml/minuto) (11)

b)*Estudio hormonal*: todos los pacientes recolectaron dos muestras de orina de 24,0 hs para determinación de cortisol libre urinario (CLU) y creatinina. Las muestras de saliva fueron obtenidas a las 23,0 hs en dos días no consecutivos para la determinación de cortisol (SAF²³). Luego de la administración oral nocturna de 1 mg de dexametasona se obtuvieron muestras matutinas de saliva y suero para determinación de cortisol (SAF^{dex} y F^{dex} respectivamente). En los sujetos con SAF^{dex} y F^{dex} > 50,0 y 2,0 nM, respectivamente, se realizó el test de supresión con 2 mg de dexametasona oral durante 48 hs (10). Para ello los sujetos recibieron 0.5 mg de dexametasona oral cada 6 hs durante 48 hs obteniéndose una muestra de suero y saliva a las 08 hs luego de la última dosis de dexametasona.

c) *Metodología*: Ensayo de cortisol plasmático y urinario: el esteroide se valoró por radioinmunoanálisis de fase sólida mediante un kit comercial (Diagnostic Products Corporation, USA). En las muestras de orina se realizó la extracción del esteroide con diclorometano previo al ensayo. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron 5,0% y 6,0%, respectivamente. La dosis mínima detectable fue 6,0 nmol/l. El cortisol plasmático se expresó en nmol/l y el urinario total en nmol/día (factor de conversión $\mu\text{g}/\text{dl} \times 27,59$: nmol/l.).

Ensayo de cortisol salival: se adaptó un equipo comercial de RIA de fase sólida DPC para la determinación plasmática de cortisol como fuera descrito (11). Para el ensayo de SAF se utilizaron 200 μl de saliva (sobrenadante) y 1 ml de trazador radiactivo (cortisol marcado con ^{125}I) con incubación posterior de 3 horas a temperatura ambiente. La curva testigo se obtuvo diluyendo con agua destilada los testigos del equipo para el rango de curva entre 0,5 nmol/l y 250,0 nmol/l. La dosis mínima detectable del ensayo de SAF fue de 0,5 nmol/l y los coeficientes de variación intra e interensayo fueron menores de 6,0% y 13,0%, respectivamente.

La creatinina se determinó por autoanalizador (Technicon RA500). El rango normal de creatininuria de 24 horas fue de 13,0-25,0 mg cr/kg/día.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresan como media $\pm$ DS, excepto que se especifique de otra manera.

Los niveles hormonales entre los grupos se compararon utilizando el análisis de varianza ANOVA. La correlación de las concentraciones de SAF-dex y Fdex se realizaron utilizando el test de Spearman.

Para estimar los valores de corte se utilizó la curva ROC (características operativas del receptor; receiver operating characteristics) optimizada para sensibilidad.

Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0,05$. Se utilizó el programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 11.5, Spss Inc, Chicago.IL).

RESULTADOS

Para descartar SC manifiesto (análisis ROC) el grupo de referencia definió: $CLU \leq 248,0$ nM/d (S: 95,2%; E:100,0 %); $SAF^{23} \leq 3,8$ nM (S:100,0%; E: 97,5%); $SAF^{dex} \leq 2,0$ nM (S:100,0%; E: 100,0%) y $F^{dex} \leq 50,0$ nM (S: 100,0%, E:100,0%) que se indican con líneas punteadas horizontales en las figuras 1,2,3 y 4. Los valores de CLU, SAF^{23} , SAF^{dex} y F^{dex} obtenidos en la población estudiada se grafican en las figuras 1,2,3 y 4 respectivamente.

Cortisol libre urinario de 24 horas (Figura 1)

En IA se demostró que en el 95% de los sujetos la concentración de CLU ($147,0 \pm 42,0$ nM/d) fue significativamente mayor que la de los controles ($96,0 \pm 47,0$ nM/d) ($p = 0,0001$). Sin embargo ningún sujeto tuvo un valor atípico o extremo, no superando en ningún caso el valor de corte ($248,0$ nM/d) definido para excluir SC manifiesto.

En HTA el 95% de la población estuvo por debajo del valor de corte ($CLU < 248,0$ nM/d). Sin embargo se observaron valores atípicos y extremos ($363,0$; $650,0$ y $2004,0$ nM/d, respectivamente).

No hubo diferencias significativas en las concentraciones de CLU en DM1 ($111,0 \pm 46,0$ nM/d), LR ($79,0 \pm 29,0$ nM/d) y H ($108,0 \pm 36,0$ nM /d) ($p^0,122$)

Cortisol nocturno en saliva (Figura 2)

En DM1 ($1,31 \pm 0,92$ nM), H ($1,0 \pm 0,63$ nM) y LR ($1,32 \pm 0,5$ nM) la concentración de SAF^{23} fue significativamente menor ($p \leq 0,035$) que la de los controles ($1,98 \pm 0,96$ nM).

En HTA, la concentración de SAF^{23} ($3,43 \pm 3,2$ nM) fue significativamente mayor que la de los controles ($p = 0,0001$), hallándose 2 valores atípicos ($5,0$ y $4,0$ nM) y 2 valores extremos ($13,0$ y $12,0$ nM).

En DM2 e IA el SAF^{23} ($1,87 \pm 0,84$ nM y $2,1 \pm 0,82$ nM, respectivamente) no fue diferente al de los controles ($p^0,382$)

Cortisol salival y plasmático luego de la administración de 1,0 mg de dexametasona oral nocturna (Figuras 3 y 4)

En todas los sujetos estudiados ($n = 164$) SAF^{dex} se correlacionó positiva y significativamente con F^{dex} ($r: 0.82$; $p < 0.0001$).

En DM2: cuatro sujetos con asociada obesidad ($IMC > 29,0$ kg/m²) demostraron ausencia de supresión de cortisol en saliva ($2,4$; $2,8$; $3,8$; $3,2$ nM) y suero ($60,6$; $69,0$; $104,0$ y $80,0$ nM) luego de la administración nocturna de $1,0$

mg de dexametasona oral. A estos sujetos se les realizó el test de supresión con 2,0 mg de dexametasona durante 48 hs comprobándose en los 4 casos supresibilidad normal de cortisol en saliva (0,5 nM; 1,0 nM; 1,0 nM y 0,6 nM) y en suero (13,8 nM; 13,8nM; 41, 0 y 22,0 nM).

En IA, el límite superior o bigote del diagrama de cajas muestra un valor de cortisol salival y sérico por encima del valor de corte (2,2 nM y 63,0 nM, respectivamente). Estos valores corresponden a una paciente (caso #3 descrito a continuación) en quien también se demostró la ausencia de supresión de cortisol en saliva y suero luego de la administración de 2,0 mg de dexametasona oral durante 48 hs (2,6 nM y 69,0 nM, respectivamente), probándose la alteración del mecanismo de retroalimentación negativa del cortisol sobre el eje hipotálamo-hipófiso-adrenal.

En HTA, dos pacientes evidenciaron valores extremos en saliva (2,0; 6.0 nM) y en suero (414,0 y 275,0 nM). La administración de 2,0 mg de dexametasona durante 48 hs no modificó estas concentraciones que fueron consideradas patológicas.

La concentraciones de SAF^{dex} ($1, 26 \pm 0,64$ nM, $1,0 \pm 0,68$ nM y $0, 86 \pm 0, 41$ nM) correspondientes a los sujetos de los grupos DM¹, H y LR, respectivamente, no fueron significativamente diferentes a la obtenida en los controles ($1, 2 \pm 0, 52$ nM; $p > 0.06$).

Las concentraciones de F^{dex} ($28,76 \pm 14, 3$ nM, $28, 2 \pm 13,5$ nM y $24, 8 \pm 11, 5$ nM) correspondientes a DM¹; H y LR fueron similares a la de los controles ($25,7 \pm 13,1$ nM; $p > 0.509$ en todos los casos).

Diagnóstico de síndrome de Cushing subclínico en la población estudiada

Las pacientes #1 y # 2 pertenecían al grupo HTA con obesidad central y la paciente #3 al grupo IA (Tabla 1).

Realizado el diagnóstico positivo de SC se investigó la etiología del síndrome. Las determinaciones de ACTH orientaron a una etiología ACTH-dependiente (paciente #1 y 2) y ACTH independiente (paciente #3).

El estudio por imágenes (RMN selar) reveló la presencia en #2 de una imagen intrapituitaria hipodensa compatible con microadenoma. En la paciente #1 la RMN fue negativa y las concentraciones plasmáticas de ACTH obtenidas a partir del muestreo de senos petrosos inferiores revelaron la presencia de gradiente central de ACTH. El abordaje quirúrgico hipofisario transepto-esfenoidal resultó en la exéresis de corticotropinomas en ambos casos. Las pacientes evolucionaron con hipocorticismismo postoperatorio.

A la paciente #3 se le realizó adrenalectomía unilateral derecha por vía

laparoscópica con el hallazgo de un adenoma corticoadrenal de 3 cm de diámetro. El seguimiento postoperatorio reveló el desarrollo de hipoadrenalismo.

Valor diagnóstico de cortisol en orina de 24 h, saliva nocturna, suero y saliva matutinas luego de la administración oral de 1,0 mg de dexametasona para Síndrome de Cushing subclínico

Confirmado el diagnóstico de SCS en los 3 casos descriptos e incorporadas las concentraciones hormonales al grupo de SC manifiesto se redefinieron los valores de corte mediante el análisis ROC para cortisol urinario total, cortisol en saliva nocturno, cortisol en saliva y suero matutinos post 1,0 mg de dexametasona oral nocturna (Tabla 2)

El cortisol en saliva ($SAF_{dex} > 2,0 \text{ nM}$) y/o circulante ($F_{dex} > 50,0 \text{ nM}$) post 1,0 mg de dexametasona resultó ser el test más sensible para el diagnóstico de SCS (S: 100,0 %; E: 97,3% en ambos)

DISCUSIÓN

Este es el primer estudio prospectivo en Argentina que investiga la presencia de Síndrome de Cushing Subclínico en una población hospitalaria ambulatoria constituida por individuos diabéticos con mal control metabólico, tumores adrenales de aparición incidental, hipertensos con asociada obesidad central, hirsutismo de etiología desconocida y litiasis renal recurrente. La evaluación de esta población definida como “de alto riesgo” se realizó utilizando las determinaciones de cortisol habituales (cortisol circulante y urinario) y las actualmente recomendadas (cortisol en saliva nocturno)(10,11).

En nuestro conocimiento este es el primer estudio clínico que utiliza el cortisol en saliva post dexametasona en el algoritmo inicial diagnóstico de SCS. En este estudio se confirmó SCS en el 3,0 % de la población estudiada. El diagnóstico correspondió a tres mujeres, en edades entre 35 y 52 años, dos pertenecientes al grupo de hipertensos con asociada obesidad central y una paciente estudiada por presentar un tumor adrenal incidental. En los tres casos la prueba que aportó datos consistentes de hipercorticismismo fue la determinación de cortisol en suero y/o saliva luego de la administración de dexametasona. El exceso de cortisol en las dos pacientes hipertensas era ACTH dependiente, demostrándose la presencia en ambos casos de un microadenoma hipofisario secretor de ACTH. La paciente con el tumor adrenal incidental demostró un exceso de cortisol ACTH independiente, indicán-

dose la exéresis de la glándula suprarrenal comprometida. En los tres casos las pacientes desarrollaron hipoadrenalismo post operatorio, confirmándose el diagnóstico inicial.

La mayoría de los estudios de detección de SCS fueron realizados en series de pacientes con incidentalomas adrenales siendo la prevalencia de este síndrome muy variable según las series (1,3,4,5). Por el contrario, hemos hallado sólo 2 estudios (9,12) realizados en poblaciones de hipertensos, dirigidos a detectar la prevalencia de formas secundarias de hipertensión arterial. Sin embargo estos trabajos no profundizaron sobre la relación entre hipertensión arterial y variables antropométricas. Teniendo en cuenta la distribución de la grasa corporal característica del exceso de cortisol y con el objeto de sensibilizar la investigación, nuestra población de estudio incluyó sujetos hipertensos con asociada obesidad central, detectándose en este grupo 2 pacientes con SCS.

Contrariamente a hallazgos previos de nuestro grupo (6), en los pacientes con Diabetes Mellitus tipo 1 y 2 con mal control metabólico, no se identificaron casos de SCS.

El análisis estadístico reveló que la determinación circulante y/o en saliva luego de la administración de 1 mg de dexametasona oral nocturna resultó ser la prueba diagnóstica de mayor sensibilidad para SCS (S:100%; E: 97,3%). En nuestra experiencia este test continúa siendo el más sensible para el diagnóstico de hipercorticismismo endógeno tanto en estadio subclínico como manifiesto (10).

RESUMEN

El síndrome de Cushing Subclínico (SCS) es un estado bioquímico de exceso de cortisol en ausencia del cuadro clínico clásico de hipercorticismismo manifiesto, siendo un desafío su diagnóstico.

Se investigó SCS en una población de riesgo constituida por 100 pacientes ambulatorios con diabetes mellitus y mal control metabólico (n=63); tumores adrenales incidentales (n=12); hipertensión arterial con obesidad central (n=10); hirsutismo (n=5) y litiasis renal (n=10). El grupo de referencia incluyó 100 voluntarios sanos y 21 pacientes con Síndrome de Cushing manifiesto (SC). El estudio fue autorizado por el Comité de Ética de la Institución y los participantes dieron su consentimiento por escrito. Todos recolectaron orina de 24 hs para cortisol libre urinario (CLU); saliva a las 23 hs para cortisol (SAF²³) y obtuvieron saliva y sangre matutinas para cortisol post 1 mg de dexametasona oral nocturna (SAF^{dex} y F^{dex}, respectivamente).

Cuando no se logró la supresión, se realizó el test convencional con 2 mg de dexametasona. Ningún sujeto recibía drogas que afectaran la función adrenal. Se determinó cortisol en saliva, suero y orina por RIA. En los pacientes con un resultado patológico se midió ACTH pl.(IRMA).El análisis estadístico se realizó con SPSS (ANOVA y ROC) definiéndose sensibilidad (S) y especificidad (E). Un valor de $p \leq 0,05$ fue considerado significativo. Resultados: se diagnosticó SCS en 3 pacientes (#1 y 2: hipertensos; #3 tumor adrenal incidental). El SCS fue ACTH dependiente (#1 y #2) e independiente (#3). Se redefinió el valor diagnóstico para SCS: CLU > 124,0 nM/d (S:92,6 %; E:69,0 %); SAF²³ >3,8 nM (S: 93,3%, E: 99,0%);SAF^{dex} >2,0 nM (S:100,0%, E: 97,3%) y F^{dex} >50,0 nM (S:100,0%; E: 97,3%)

Conclusión: se confirmó SCS en el 3,0% de la población de riesgo estudiada. La determinación de cortisol en suero y/ ó en saliva luego de la administración de 1 mg de dexametasona oral nocturna fue la prueba de mayor sensibilidad para SCS (S: 100,0%, E: 97,3%).

ABSTRACT

Subclinical Cushing's Syndrome (SCS) is a state of cortisol excess without the typical clinical features of overt hypercorticism and it remains a diagnostic challenge for the endocrinologist.

SCS was investigated in a population at risk of 100 outpatients with diabetes mellitus and poor metabolic control (n=63); incidental adrenal masses (n =12); high blood pressure with central obesity (n = 10); hirsutism (n =5) and kidney stones (n = 10). Control group included 100 healthy volunteers and 21 patients with overt Cushing's syndrome (CS). This protocol was approved by the Ethics Committee of the Institution and all the participants gave their consent. All patients collected 24 hour urine samples for urinary free cortisol (UFC); late - night saliva for cortisol (SAF²³) and morning saliva and blood samples for cortisol after 1 mg overnight dexamethasone (SAF^{dex} and F^{dex}, respectively). None was taken drugs that may interfere with adrenal function. Cortisol in saliva, serum and urine was determined by RIA. When suppression was not achieved, the standard 2 mg dexamethasone suppression test was performed. ACTH was measured by IRMA in cases of pathological results.

SPSS was used for statistical analysis (Anova and ROC analysis). $P < 0.05$ was considered significant.

Results: SCS was diagnosed in 3 patients (#1 and 2 with high blood pressure and central obesity; and #3 with adrenal incidentaloma).Patients #1 and 2 had ACTH dependent CS and #3 had ACTH independent CS. The threshold

value for SCS was: UFC > 124,0 nM/d (S:92,6 %; E:69,0 %); SAF²³ >3,8 nM (S: 93,3%, E: 99,0%);SAF^{dex} >2,0 nM (S:100,0%, E: 97,3%) y F^{dex} >50,0 nM (S:100,0%; E: 97,3%)

Conclusion: the prevalence of SCS in the studied population was 3%. Serum and salivary cortisol after overnight 1 mg dexamethasone was the most sensitive test in the diagnosis of SCS (S: 100%; E: 97,3%)

REFERENCIAS

1. Chiodini I. Diagnosis and treatment of subclinical hypercortisolism. 2011 J Clin Endocrinol Metab 96:1223-1236
2. Garrapa GG, Pantanetti P, Arnaldi G, Mantero F, Faloia E. Body composition and metabolic features in women with adrenal incidentaloma or Cushing's syndrome. 2001 J Clin Endocrinol Metab 86:5301-5306
3. Tauchmanová L, Rossi R, Biondi B, Pulcrano M, Nuzzo V, Palmieri EA, Fazio S, Lombardi G 2002. Patients with subclinical Cushing's syndrome due to adrenal adenoma have increased cardiovascular risk. J Clin Endocrinol Metab 87:4872-4878.
4. Chiodini I, Morelli V, Masserini B, Salcuni AS, Eller-Vainicher C, Viti R, Coletti F, Guglielmi G, Battista C, Carnevale V, Iorio L, Beck-Peccoz P, Arosio M, Ambrosi B, Scillitani A. 2009 Bone mineral density, prevalence of vertebral fractures and bone quality in patients with adrenal incidentalomas with and without subclinical hypercortisolism: an Italian Multicenter Study. J Clin Endocrinol Metab 94:3207-3214
5. Mantero F, Terzolo M, Arnaldi G, Osella G, Masini AM, Alí A, Giovagnetti M, Opocher G, Angeli A. A Survey on adrenal incidentaloma in Italy. 2000 J Clin Endocrinol Metab 85:637-644
6. Contreras LN, Cardoso E, Lozano MP, Pozzo J, Pagano P, Claus-Hemmerberg H. 2000. Detection of preclinical Cushing's syndrome in overweight type 2 diabetic patients, Medicina (Buenos Aires) 60:326-30
7. Catargi B, Rigalleau V, Poussin A, Ronci-Chaix N, Bex V, Vergnot V, Gin H, Roger P, Tabarin A. Occult Cushing's syndrome in type 2 diabetes. 2003. J Clin Endocrinol Metab 88: 5808-5813
8. Reimondo G, Pia A, Allasino B, Tassone F, Bovio S, Boretta G, Angeli A, Terzolo M. 2007 Screening of Cushing's syndrome in adult patients with newly diagnosed diabetes mellitus. Clin Endocrinol 67:225-229
9. Omura M, Saito J, Yamaguchi K, Kakuta Y, Nishikawa T. 2004 Prospec-

- tive study on the prevalence of secondary hypertension among hypertensive patients visiting a general outpatient clinic in Japan. *Hypertens Res* 27:193-202
10. Nieman LK, Biller BM, Findling JW, Newell-Price J, Savage MO, Stewart PM, Montori VM 2008. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 93:1526-1540
 11. Cardoso EML, Arregger AL, Tumilasci OR, Contreras LN. 2009 Diagnostic value of salivary cortisol in Cushing's syndrome (CS), *Clin Endocrinol* 70:516-521
 12. Anderson GH, Blakeman N, Streeten DH. 1994. The effect of age on prevalence of secondary forms of hipertensión in 4429 consecutively referred patients. *J Hypertens* 12:609-615

Tabla 1: Diagnóstico de Síndrome de Cushing subclínico

Paciente # Grupo	sexo	edad (años)	CLU ^a (nM/d)	SAF ^{23a} (nM)	SAF ^{dex} (nM)	F ^{dex} (nM)	ACTH (pg/ml)	Dx Histopatológico
#1 HTA	femenino	35	363,0;240,0	5,0;4,5	7,0	414,0	20,0	Corticotropinoma
#2 HTA	femenino	52	2004,0;650,0	13,0;12,0	6,0	275,0	27,0	Corticotropinoma
#3 IA	femenino	48	200,0;190,0	1,5;0,8	2,2	63,0	5,0	Adenoma Corticoadrenal

Abreviaturas: HTA: hipertensión arterial con obesidad central; IA: tumor adrenal incidental; CLU: cortisol urinario de 24 hs; SAF²³: cortisol salival nocturno; SAF^{dex}: cortisol salival matutino post 1 mg de dexametasona oral nocturna; F^{dex}: cortisol plasmático total matutino post 1 mg de dexametasona oral nocturna; ACTH: hormona adrenocorticotrófica; Dx: diagnóstico.

^a las muestras fueron obtenidas en dos días no consecutivos.

Tabla 2. Valor diagnóstico para Síndrome de Cushing subclínico de cortisol en orina de 24 horas, saliva nocturna, suero y saliva matutinos post 1 mg de dexametasona.

Cortisol (valor de corte) ^a	Sensibilidad [% (95% IC)]	Especificidad [% (95% IC)]	AUC ^{ROC} (95%IC)
Cortisol urinario de 24 hs (CLU >124,0 nmol/d)	92,6 (75,7-98,9)	69,0 (63,4-74,3)	0,867 (0,825-0,902)
Cortisol salival nocturno (SAF ²³ > 3,8 nM)	93,3 (77,9-99,0)	99,0 (97,0-99,8)	0,949 (0,919-0,971)
Cortisol salival post 1 mg dexametasona (SAF ^{dex} >2,0 nM)	100,0 (87,1-100,0)	97,3 (93,2-99,2)	0,998 (0,976-1,000)
Cortisol plasmático post 1 mg dexametasona (F ^{dex} >50,0 nM)	100,0 (85,6-100,0)	97,3 (93,2-99,2)	0,998 (0,975-1,000)

Abreviaturas: IC: intervalo de confianza; AUC: área por debajo de la curva ROC.
^a Los valores de corte son estimados mediante el análisis ROC y optimizados por sensibilidad.

Figura 1. Concentración de cortisol urinario en individuos sanos, diabéticos tipo1, diabéticos tipo 2, pacientes con tumores adrenales incidentales, hipertensos con obesidad central, mujeres con hirsutismo, pacientes con litiasis renal y pacientes con Síndrome de Cushing maniifiesto

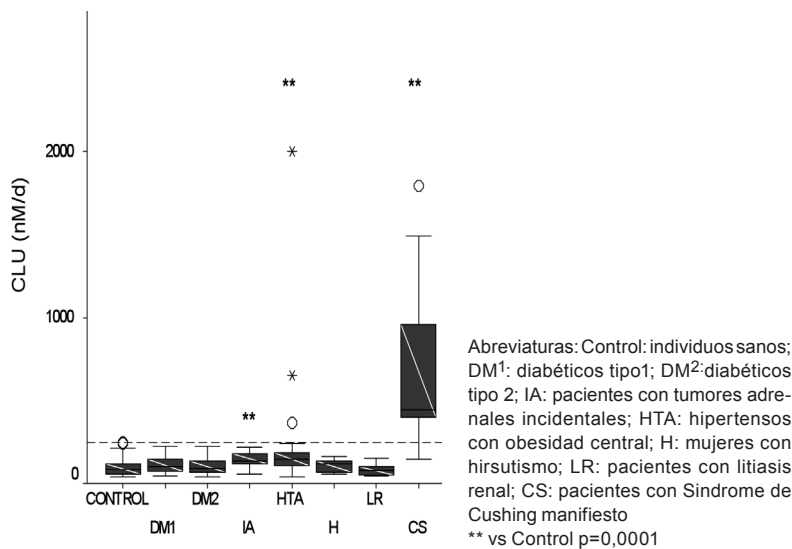


Figura 2. Concentración de cortisol salival nocturno en C, DM¹, DM², IA, HTA, H, LR y CS

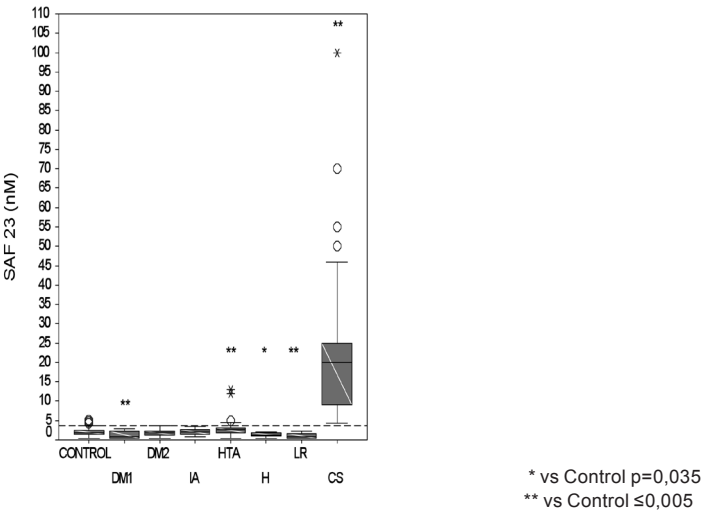


Figura 3. Concentración de cortisol salival matutino luego de 1,0 mg de dexametasona oral nocturno en C, DM¹, DM², IA, HTA, H, LR y CS

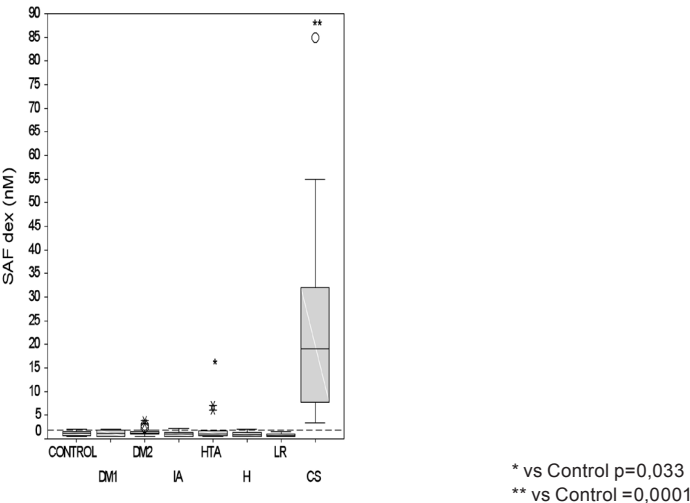
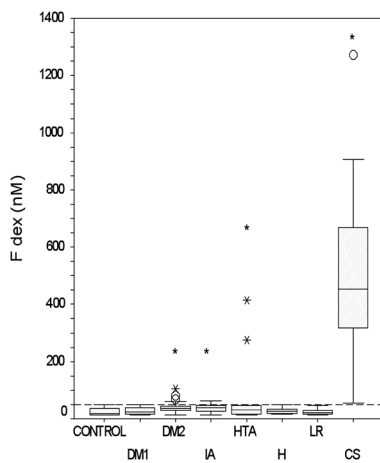


Figura 4. Concentración de cortisol plasmático matutino luego de la administración de 1,0 mg de dexametasona oral nocturna en C, DM¹, DM², IA, HTA, H, LR y CS



*vs Control $p \leq 0,001$.



EL SISTEMA COLINÉRGICO NO NEURONAL COMO MODULADOR DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE FAVORECEN LA TRANSFORMACIÓN MALIGNA ANTE UNA SITUACIÓN INFLAMATORIA.

Dr. Español, Alejandro Javier

Laboratorio de Inmunofarmacología Tumoral - Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos - CONICET

INTRODUCCIÓN

La inflamación es una reacción compleja y altamente regulada que surge ante una injuria. Del establecimiento del proceso inflamatorio dependen procesos fisiológicos, sin embargo, la inflamación puede ser potencialmente dañina para el organismo hospedador y la falta de resolución de este proceso puede conducir a enfermedades crónicas como el cáncer (1).

La idea de la relación funcional entre inflamación y cáncer se apoya en que algunos irritantes inducen un proceso inflamatorio con proliferación local de células y expresión proteica típica de un proceso tumoral (2).

Los fibroblastos son miembros activos en el proceso inflamatorio y también en la formación y remodelación tisular. La participación de los fibroblastos es esencial en la regulación del sistema inmunológico cumpliendo un rol clave en la transición entre inmunidad innata y adaptativa (3).

Existen diversas causas que generan procesos inflamatorios. El lipopolisacárido (LPS) presente en las bacterias Gram negativas es un flogógeno potente que en combinación con citoquinas inflamatorias como el interferón gamma (IFN γ) es frecuentemente utilizada para estudiar la influencia del proceso inflamatorio en la regulación de la expresión proteica (4). Un factor que típicamente se activa ante una situación inflamatoria es el factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B) el cual puede inducir la síntesis de la óxido nítrico sintasa 2 (NOS2) (5).

Un mediador pleiotrópico en los procesos inflamatorios y el cáncer es el óxido nítrico (NO) producido por las NOS. Se han reportado evidencias contradictorias respecto del efecto del NO en la proliferación celular; altos niveles de NO están generalmente relacionados con citotoxicidad, mientras que valores bajos o medios generalmente se asocian con supervivencia y

proliferación (6-7). El NO y sus metabolitos derivados también cumplen un rol como moduladores del sistema inmune frente a tumores (1).

Los receptores muscarínicos (RM) pertenecen a la familia de receptores de 7 dominios transmembrana acoplados a proteínas G (8) y recientemente se ha descrito que están presentes en fibroblastos y células endoteliales. Su activación puede modular la diferenciación celular, la angiogénesis, la proliferación y la respuesta inmune en diversas situaciones patológicas como enfermedades autoinmunes (9-10).

Por esto mediante la utilización de un modelo murino de fibroblastos normales NIH3T3 y fibroblastos tumorales SCA-9 de glándula salival, investigaremos si la presencia de inflamógenos activa vías de señalización semejantes a las que se encuentran activadas en una célula tumoral durante la proliferación celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular: Se utilizaron líneas murinas tumoral SCA-9 y normal NIH3T3 tratadas o no con una combinación de LPS de *Escherichia coli* (10 ng/ml) e IFNg (0,5 ng/ml) durante 24 hs (NIH3T3*).

Ensayos de Western blot (Wb): Las muestras fueron sembradas en geles SDS-PAGE (80 µg de proteína por calle) y sometidas a electroforesis. Luego de la transferencia y lavados, las membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios policlonales específicos y luego con secundarios conjugados a peroxidasa. Las bandas fueron detectadas por quimioluminiscencia y cuantificadas densitométricamente.

Ensayo de proliferación celular: La proliferación se evaluó mediante un ensayo colorimétrico utilizando el reactivo MTT. La proliferación fue calculada como porcentaje con respecto a las células no tratadas (100%). Los resultados se expresaron como promedios ± error estándar (E.S).

Medición de la producción de NO: La producción de NO se evaluó midiendo la acumulación de nitritos (NO²⁻) en el sobrenadante de cultivo mediante el método de Griess.

RESULTADOS

1. Expresión de receptores muscarínicos

Dado que el proceso inflamatorio puede modular los niveles de diferentes proteínas, mediante ensayos de Wb con anticuerpos específicos contra los subtipos de RM, determinamos que las células NIH3T3 tratadas o no con inflamógenos expresan los subtipos M¹, M², M³ y M⁴, mientras que las células SCA-9 expresan los subtipos M¹, M², M³ y M⁵ (Figura 1).

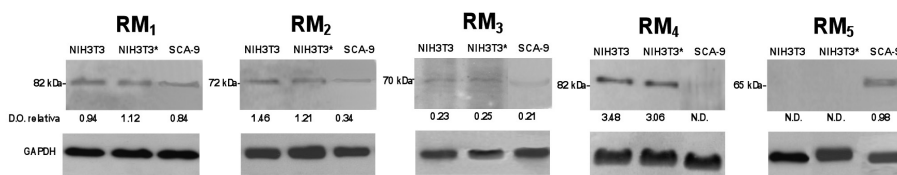


Figura 1. Ensayo de Wb para detectar la expresión de RM en células NIH3T3, NIH3T3* y SCA-9. El peso molecular de cada banda se indica a la izquierda. El análisis densitométrico de las bandas se expresa en densidad óptica (D.O.) relativa al valor de la banda del control de carga de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenada (GAPDH). Se muestra un ensayo representativo de 4 realizados.

2 Modulación muscarínica de la proliferación

Luego de determinar la expresión de RM estudiamos si los mismos son funcionales mediante ensayos de proliferación. El agregado de concentraciones crecientes del agonista muscarínico sintético carbacol produjo un aumento significativo en la proliferación, siendo la concentración efectiva máxima (CE_{max}) 10⁻⁸ M para NIH3T3, y 10⁻⁹M para NIH3T3* y SCA-9 (Figura 2). Las CE_{max} de cada grupo experimental fueron utilizadas en los ensayos posteriores.

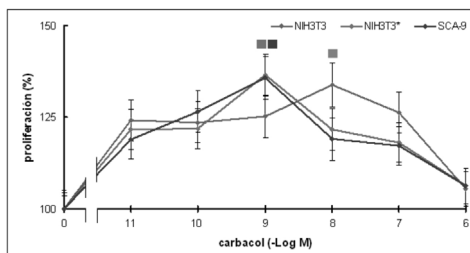


Figura 2. Curvas concentración-respuesta de carbacol sobre la proliferación en células NIH3T3 (■), NIH3T3* (●) y SCA-9 (▲). Los valores representados son promedios ± E.S. de 8 experimentos realizados por duplicado. ■ representa la concentración efectiva máxima para cada grupo.

Mediante el uso de inhibidores enzimáticos determinamos que este efecto estimulante del carbacol está mediado en las células NIH3T3* y SCA-9 por PLC y NOS1, mientras que en las células SCA-9 además por NOS2 y NOS3. En las células NIH3T3 el efecto estimulante del carbacol no está mediado por la activación de la vía PLC/NOS (Figura 3).

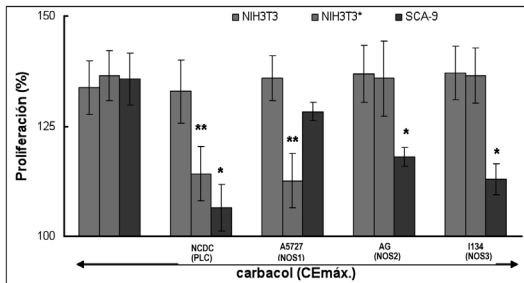


Figura 3. Papel de la vía PLC/NOS en el efecto del carbacol sobre la proliferación en células NIH3T3 (■), NIH3T3* (■) y SCA-9 (■). Los valores representados son promedios $\pm$ E.S. de 6 experimentos realizados por duplicado. * $p<0,01$; ** $p<0,05$ respecto del carbacol

3. Modulación muscarínica de la actividad de NOS

Dado que en las células NIH3T3* y SCA-9 las NOS participan en el efecto estimulante del carbacol, determinamos cuales de sus isoformas se expresan. En las células NIH3T3 el agregado de inflamógenos induce un aumento en los niveles de expresión de NOS1, la única isoforma que se expresa; mientras que las células SCA-9 expresan las tres isoformas de NOS (Figura 4).

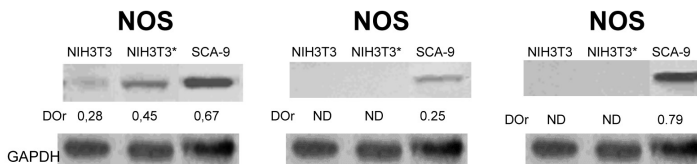


Figura 4. Ensayos de Wb para caracterizar la expresión de las isoformas de NOS en células NIH3T3, NIH3T3* y SCA-9. El análisis densitométrico de las bandas se expresa como Do relativa (Dor) al valor de GAPDH. ND: no descrito. Se muestra un ensayo representativo de tres.

El agregado de concentraciones crecientes de carbacol produjo un efecto estimulante sobre la producción de NO siendo la CEmax la misma que la

medida para proliferación. Este efecto estimulante en todas las células estudiadas esta mediado por la activación de PLC y NOS1, mientras que en las células SCA-9 además por NOS2 y NOS3 (Figura 5)

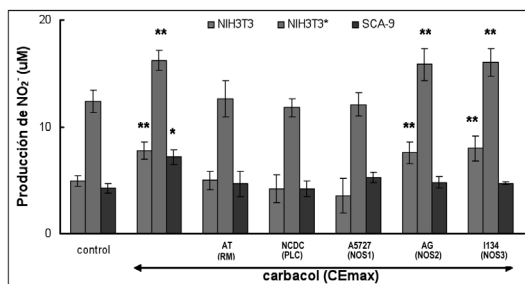


Figura 5. Determinación de la actividad de NOS medida como nitritos (NO₂⁻) en células NIH3T3 (■), NIH3T3* (■) y SCA-9 (■), tratadas con el agonista carbacol en ausencia o en presencia de atropina (AT), NCDC, A5727, AG o I134. Los valores representados son promedios ± E.S. de 6 experimentos realizados por duplicado. *p<0,001, **p<0,01 vs. control.

4. Participación del factor nuclear κB:

Estudiamos la participación del NF-κB debido a que este factor se activa en procesos inflamatorios y que además cumple un rol relevante en la proliferación de distintos tipos celulares. Determinamos que el NF-κB participa en el efecto del carbacol sobre la proliferación y sobre los niveles de NO (Figura 6).

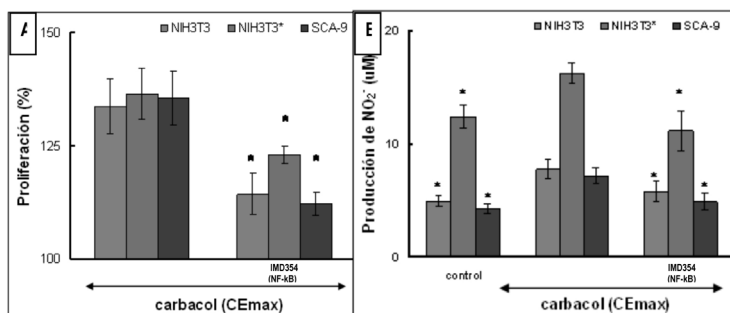


Figura 6. Papel del factor nuclear κB en el efecto del carbacol sobre A) la proliferación o B) la actividad de NOS en células NIH3T3 (■), NIH3T3* (■) y SCA-9 (■) tratadas con el agonista carbacol en ausencia o en presencia de IMD0354. Los valores representados son promedios ± E.S. de 7 experimentos realizados por duplicado. *p<0,001 vs. carbacol.

Teniendo en cuenta que la inhibición de la vía del NF- κ B revirtió el efecto estimulante del carbacol tanto en la proliferación como en la producción de NO, decidimos estudiar si el carbacol era capaz de modular la expresión de las enzimas NOS vía NF- κ B.

Por Wb demostramos que mientras que el tratamiento con carbacol incrementó la expresión de NOS1 en las células NIH3T3 sometidas o no a estímulos inflamatorios (Figura 7A-B), en las células SCA-9 incrementó la expresión solo de NOS2 y NOS3 (Figura 7C). El tratamiento previo de las células con el inhibidor de la vía de NF- κ B, MG132 (2×10^{-5} M) redujo el efecto producido por el carbacol (Figura 7)

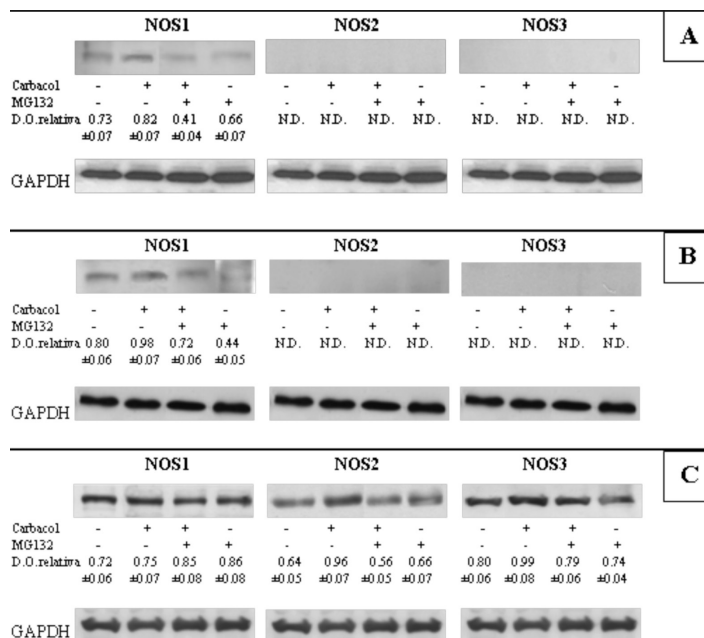


Figura 7. Ensayos de Wb de NOS en células NIH3T3 (A), NIH3T3* (B) y SCA-9 (C) incubadas con carbacol y/o MG132. El análisis densitométrico de las bandas se expresa como D.O. relativa al nivel de GAPDH. Se muestra un ensayo representativo de tres.

DISCUSIÓN

Las células NIH3T3 son fibroblastos murinos normales derivados de glándula salival murina, ampliamente utilizados en investigación básica y constituyen un sistema adecuado para conocer el rol de estas células en el proceso inflamatorio puesto que responden a diferentes estímulos y muestran activación de vías de señalización que clásicamente se asocian a la respuesta inflamatoria (11), mientras que las células SCA-9 son células que presentan una morfología fibroblastoidea de glándula salival murina (12) por lo que pueden ser consideradas la contraparte tumoral de las células NIH3T3.

Entre los mediadores que se producen en procesos inflamatorios se encuentran los productos de las enzimas NOS que se han relacionado con ciertas enfermedades inflamatorias y el cáncer (13).

Demostramos que las células NIH3T3 expresan constitutivamente los RM de los subtipos M¹, M², M³ y M⁴ sin que esta expresión se modifique por un estímulo inflamatorio de 24 hs. Al igual que las células NIH3T3, las células SCA-9 expresan los subtipos M¹, M² y M³ así como también el subtipo M⁵ siendo esta la primera que vez que se describe la presencia de RM en este tipo celular.

Encontramos que la activación muscarínica puede promover la proliferación en fibroblastos en condiciones basales o inflamatorias. Resultados similares fueron obtenidos por Matthiesen y col., trabajando en fibroblastos humanos (14). En células SCA-9 también se observa que la activación muscarínica promueve la proliferación; efectos análogos fueron reportados en células tumorales de colon y mama (15).

Además observamos que el tratamiento con inflamógenos produce una sensibilización a la estimulación colinérgica equivalente a las de las SCA-9, que podría ser explicada, al menos en parte, por un mecanismo semejante al descrito por Tliba y col (15). Estos autores demostraron que la estimulación con IFN γ de células humanas normales de músculo liso puede aumentar la liberación de Ca²⁺ en respuesta a agonistas colinérgicos. Este incremento podría modificar el número de receptores y/o su afinidad por el ligando y como consecuencia la sensibilidad al agonista.

La mayor sensibilidad de las células SCA-9 en relación a las células NIH3T3 podría deberse al menos en parte a la mayor expresión de RM y/o su afinidad por el ligando que presentan las células tumorales en relación a las normales. Un incremento de la expresión de los RM en un tejido tumoral respecto de su contraparte normal ya ha sido descrito por diversos autores.

En este sentido Frunch y col. (16) han descrito que las células de colon humano presentan una mayor expresión del subtipo M³ respecto del tejido normal. Resultados análogos han sido observados en glándula prostática humana (17).

Nuestros resultados evidencian por primera vez que en células NIH3T3 tratadas con inflamógenos, a diferencia de las no tratadas, la respuesta proliferativa desencadenada por el agonista colinérgico involucra la vía PLC/NOS en forma equivalente a lo observado en las células tumorales SCA-9. Lattin y col. propusieron que las proteínas G regulan no solamente la señalización de los receptores acoplados a proteína G, sino también la señalización de los receptores Toll de tipo 4 (18). Más aún, la estimulación con LPS de monocitos humanos U937 causa la fosforilación de la proteína G^{α12} en estas células, involucrando a esta proteína en la respuesta al LPS (19). También se han descrito efectos semejantes sobre el complejo bg de estas proteínas. Estas interacciones podrían producirse en las células NIH3T3*, involucrando a la vía PLC/NOS en el efecto del carbacol, incrementando la sensibilidad de la respuesta proliferativa en células inflamadas.

Ha sido ampliamente estudiado el rol de moléculas inductoras de la inflamación, como el LPS, en la expresión y función de las enzimas NOS. Numerosos trabajos demuestran niveles muy aumentados de NO debido a la regulación positiva en la expresión de la isoforma 2 de la NOS (20). Sin embargo, es menos conocido el efecto de inflamógenos sobre las isoformas calcio-dependientes como NOS1 y NOS3. Walter y col. demostraron que una combinación de LPS e IFN γ puede aumentar los niveles de NO producidos por las isoformas calcio-dependientes en células endoteliales (21). Resultados semejantes fueron obtenidos por Gotoh y col. en macrófagos murinos tratados también con la misma combinación de inflamógenos (22). Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por nosotros en células NIH3T3*, las cuales presentan una mayor expresión y actividad de NOS1 respecto de las células sin inflamógenos.

Aún cuando anteriormente se asociaba la producción de bajos niveles de NO derivados de isoformas constitutivas de la NOS con la proliferación celular, trabajos recientes vinculan niveles aumentados y sostenidos de NO con un incremento en la proliferación de células endoteliales, fibroblastos de pulmón de pacientes con esclerosis sistémica y células de glioma humanas (23). Concordantemente nuestros resultados muestran que sólo los fibroblastos inflamados, que producen mayores niveles de NO, este mediador estaría involucrado en el efecto proliferativo inducido por el agonista colinérgico en

forma equivalente a lo observado en las células tumorales SCA-9. Lala y col. (24) han reportado una asociación positiva del NO con la progresión tumoral dado que los niveles de NO son altos comparados con el tejido normal.

La activación de la vía del NF- κ B ha sido relacionada con el incremento de los niveles de expresión de distintas proteínas. Este factor se encuentra expresado en distintos tipos celulares y está involucrado en la respuesta a diferentes estímulos como: citoquinas, radicales libres, radiación UV y agentes virales o bacterianos (25).

El NF- κ B esta involucrado en el efecto proliferativo inducido por el carba-col en células NIH3T3 en ausencia o en presencia de inflamógenos así como en células tumorales SCA-9, lo que denotaría una activación constitutiva de este factor en estas células. Si bien este factor participa del crecimiento, diferenciación y apoptosis de células de pulmón, hígado y hueso, el rol del mismo en la proliferación de células normales de mama fue estudiado en profundidad por Brantley y col. (26), así como por numerosos autores en células tumorales (27).

En las células NIH3T3 o NIH3T3*, encontramos un efecto estimulante del agonista muscarínico sobre la actividad y expresión de NOS1, así como en células SCA-9 sobre la actividad y expresión de NOS2 y NOS3, que estarían mediados por la activación de la vía del NF- κ B. En este sentido, ensayos realizados en astrocitos han indicado que la inducción de NOS1 es dependiente de NF- κ B (28). En nuestro laboratorio demostramos previamente que la estimulación muscarínica produce el aumento de la expresión de NOS1 vía NF- κ B en células NIH3T3 (29). Además, también ha sido descripta la inducción de la isoforma inducible, vía NF- κ B en distintas células tumorales (30) en forma análoga a lo observado por nosotros en SCA-9.

La participación de este factor de transcripción en la activación muscarínica fue también reportada en células astrogiales, las cuales mostraron una importante reducción en la síntesis de ADN y proliferación celular por bloqueo de la vía (14).

Los fibroblastos en condiciones basales proliferan ante la estimulación muscarínica mediante la activación de vías independientes de PLC/NOS, con participación del mediador NF- κ B. Sin embargo, al ser incubados en presencia de flogógenos suman la participación de la vía PLC/NOS con participación de NF- κ B ante el estímulo muscarínico, tendiendo de esta forma hacia vías de señalización equivalentes a las observadas en las células tumorales SCA-9 donde determinamos la participación de dicha vía y mediador ante la estimulación muscarínica.

En conclusión, ante un proceso inflamatorio, se modifica la señalización intracelular de los RM, lo que resultaría en diferentes estrategias de proliferación de los fibroblastos en este proceso, semejantes a las observadas en las células tumorales SAC-9.

RESUMEN

La inflamación es una reacción compleja y altamente regulada ocasionada por una injuria. Los receptores muscarínicos (RM) son proteínas de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G cuya activación puede modular diversas funciones como la proliferación, migración celular y organización del citoesqueleto a través de proteínas efectoras como las óxido nítrico sintasas (NOS). Estas enzimas son a su vez centrales en el desarrollo del proceso inflamatorio.

Decidimos estudiar en fibroblastos murinos NIH3T3 tratados con flogógenos el efecto de la activación colinérgica sobre la proliferación, determinando la participación de las enzimas NOS así como del factor nuclear kappa B (NF- κ B) en este efecto en comparación con lo que ocurre en una célula tumoral SCA-9.

Por ensayos de inmunomarcación, demostramos que mientras que las células tumorales SCA-9 expresan los subtipos M¹, M², M³ y M⁵ así como todas las isoformas de NOS, los fibroblastos expresan constitutivamente los subtipos M¹, M², M³ y M⁴ así como la isoforma NOS1. Esta expresión de los fibroblastos no se modifica por un estímulo inflamatorio de 24 hs. La funcionalidad de los RM fue confirmada con ensayos de proliferación observándose un efecto concentración-dependiente del agonista colinérgico carbacol sobre la proliferación. El tratamiento con flogógenos produjo una sensibilización a la estimulación muscarínica. Solo en las células NIH3T3 tratadas con flogógenos el efecto del agonista sobre la proliferación está mediado por la activación de la enzima NOS1. En las células SCA-9 en cambio, depende de la NOS2 y la NOS3.

Los fibroblastos en condiciones basales, proliferan ante la estimulación muscarínica mediante la activación de NF- κ B. Sin embargo, al ser incubados en presencia de flogógenos suman la participación de la vía PLC/NOS ante el estímulo muscarínico en forma semejante a SCA-9. Concluimos que ante un proceso inflamatorio, se modifica la señalización intracelular de los RM resultando en diferentes estrategias de proliferación semejantes a las observadas en las células tumorales SAC-9.

ABSTRACT

Inflammation is a complex and highly regulated process produced as a result of injury. Muscarinic receptors (RM) are seven-transmembrane domain proteins, coupled to G proteins. The activation of RM can modulate different functions such as proliferation, cell migration and cytoskeleton organization through effector proteins including nitric oxide synthases (NOS). These enzymes are too central in the inflammatory process.

We decided study in NIH3T3 murine fibroblasts treated with inflammatory factors the effect of cholinergic activation on proliferation, determining the participation of NOS and the nuclear factor kappa B (NF- κ B), and compare it with a tumor cell SCA-9.

By immunoblot assays, we showed on one hand that SCA-9 tumor cells express M¹, M², M³, M⁵ subtypes and all NOS isoforms; on the other hand fibroblasts NIH3T3 constitutively express M¹, M², M³ and M⁴ subtypes and NOS1 isoform. This fibroblasts expression is not affected by a 24 h inflammatory stimulus.

The functionality of RM was confirmed by proliferation assays and we observed a concentration-dependent effect of the cholinergic agonist carbachol. The treatment with inflammatory factors produced sensitization to muscarinic stimulation. Just in NIH3T3 cells treated with inflammatory factors the effect of the agonist is mediated by the activation of NOS1. In SCA-9 cells however, depends on NOS2 and NOS3.

Fibroblasts proliferate under basal conditions by muscarinic activation of the NF- κ B pathway. However, when cells were incubated in presence of inflammatory factors, muscarinic stimulation added the PLC/NOS pathway together with NF- κ B participation, tending to signaling pathways equivalent to those observed in SCA-9 tumor cells.

In conclusion, in an inflammatory process there is a modification of the intracellular signals by RM; this would result to different proliferation strategies of fibroblasts during inflammation, similar to those observed in SAC-9 tumor cells.

REFERENCIAS

1. Kumar V y col. Saunders, 2009. 48-75.
2. Balkwill F y col. Lancet. 2001; 357:539-45.
3. Lo D y col. Immunol Rev. 1999; 169: 225-239.

4. Geller D y col. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 552-556.
5. Zhang Y y col. *J Immunol*. 1998; 160: 1053-1057.
6. Sazonova E y col. *Bull Exp Biol Med*. 2002; 133: 20-22.
7. Mei Y y col. *Hepatology*. 2011; 54:1777-89.
8. Wess J. *Crit Rev Neurobiol*. 1996; 10: 69-99.
9. Español A y col. *Int J Mol Med*. 2002; 9: 651-657.
10. Español A y col. *Int J Mol Med*. 2004; 13: 311-317.
11. Schenning M y col. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1773: 1664-1671.
12. Trzaskawka E y col. *Eur J Oral Sci*. 2000. 108:54-58.
13. Pacher P y col. *Physiol Rev*. 2007; 87: 315-424.
14. Matthiesen S y col. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006; 35: 621-627.
15. Tliba O y col. *Mol Pharmacol*. 2005; 69: 588-596.
16. Frucht H y col. *Clin Cancer Res*. 1999;5:2532-9.
17. Blanco M y col. *Ann Diagn Pathol*. 2004 Dec;8(6):333-6.
18. Lattin J y col. *Immunome Res*. 2008. 29;4:5.
19. Liu J y col. *Shock*. 2001; 16: 64-69.
20. Choi E y col. *Life Sci*. 2011; 88: 1121-1126.
21. Walter R y col. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994; 202: 450-455
22. Gotoh T y col. *J Cell Biol*. 1999; 144: 427-434.
23. Hua-Huy T y col. *J Rheumatol*. 2010; 37: 1680-1687.
24. Lala P y col. *Lancet Oncol*. 2001; 3:149-156.
25. Bonizzi G y col. *Trends Immunol*. 2004; 25: 280-288.
26. Brantley D y col. *Mol Biol Cell*. 2001; 12: 1445-1455.
27. Ben-Neriah Y y col. *Nat Immunol*. 2011;12:715-23.
28. Carbone D y col. *Brain Res*. 2008; 1217: 1-9.
29. Español A y col. *Inflamm Res*. 2010; 59: 227-238.
30. Chaturvedi M y col. *Oncogene*. 2011; 30:1615-30.

PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA DE ENDOCANNABINOIDES (AEA/CBS/FAAH) EN LA REGULACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO (NO) Y LAS PROSTAGLANDINAS (PGS) EN PLACENTA HUMANA.

Farina Mariana, Leguizamón Gustavo, Sordelli,
Grassetti Mariana, Morales Ramona
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)
Facultad de Cs Médicas-UBA

El consumo de drogas por mujeres embarazadas se encuentra entre 10 y 30 %, con el agravante que uno de los principales efectos son los problemas a nivel reproductivo. El tetrahidrocanabinol delta-9 o THC, principal psicoactivo de la marihuana, ejerce su acción uniéndose a receptores de cannabinoides (CB1 y CB2) y puede provocar restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) (Frank 1990) y parto prematuro (Gibson 1983). La exposición repetida a múltiples dosis produce la acumulación de dichos compuestos en los fetos, ya que estos no parecen disponer todavía de los mecanismos necesarios para su degradación.

El sistema de cannabinoides endógenos (endocannabinoides) está constituido por moléculas lipídicas que mayoritariamente derivan del ácido araquidónico, y sus receptores específicos (CB1 y CB2).

La anandamida (AEA, N-araquidoniletanolamina) es uno de los principales endocannabinoides descritos y, en los últimos años, numerosos trabajos han demostrado su participación en diversos procesos reproductivos como la fertilización, el transporte oviductal, la implantación y el desarrollo de la placenta (Kenney 1999, Gervasi 2009, Maccarrone 2009, Park 2003, Cella 2008). La AEA es sintetizada principalmente por acción de una fosfolipasa D específica (NAPE-PLD) (Di Marzo 1994) y es rápidamente catabolizada por acción de una hidrolasa de amidas de ácidos grasos (FAAH) (Ueda 1995).

Un trabajo realizado por Habayeb y col (2004) demostró que los niveles de AEA plasmática aumentan al término de la gestación en mujeres con trabajo de parto hecho que sugiere que la AEA podría ser uno de los factores involucrados en la señalización del disparo de parto a término. Unos años más tarde el mismo grupo demostró que altas concentraciones de AEA provocan una disminución del crecimiento celular en una línea de coriocarcinoma humano (Habayeb 2008). Estos datos podrían explicar, al menos en parte, que elevadas concentraciones de AEA en plasma correlacionan con

un incremento en el riesgo de abortos durante el primer trimestre (Maccarone 2002). Recientemente, Marczylo (2010) ha demostrado que la placenta humana expresa altos niveles de anandamida (AEA), aunque la relevancia de estos resultados en la interfase materno-fetal no ha sido investigada hasta el momento.

La placenta es un órgano heterogéneo que forma un vínculo físico y funcional entre la madre y el embrión en desarrollo. Este tejido se encuentra en un estado de constante crecimiento y diferenciación durante el cual provee una interfase inmune; transporta nutrientes, lípidos y agua entre la madre y el feto, y expresa diversas sustancias que participan activamente en el desarrollo y metabolismo materno-fetal.

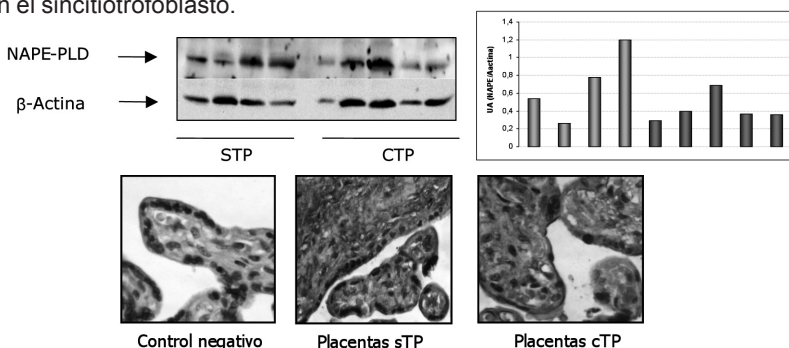
A medida que avanza la gestación se pueden detectar grandes cambios hemodinámicos que se encuentran mediados por un incremento en la producción de óxido nítrico (NO). El NO se sintetiza por acción de la óxido nítrico sintasa (NOS) en una gran variedad de tejidos. Tiene un poderoso efecto vasodilatador, contribuyendo al mantenimiento de una baja resistencia vascular en la circulación feto-placentaria (Amit A, 1998). La síntesis de NO puede ser modulada por diversos factores entre los cuales se encuentra la AEA (Cella 2008, Vercelli 2009, Aisemberg 2010).

Otro de los mediadores fundamentales en la regulación del tono vascular en la placenta son las prostaglandinas (PGs). Se sintetizan a partir del ácido araquidónico (AA) de las membranas celulares por acción de la ciclooxigenasa (COX) de la cual existen dos isoformas: COX-1 y COX-2, y son rápidamente metabolizadas por la 15-hidroxiprostaglandina dehidrogenasa (PGDH). Trabajos recientes sugieren que los endocannabinoides (AEA y 2-araquidonoilglicerol, otro importante endocanabinoide) pueden contribuir a la producción de prostaglandinas, incrementando la actividad y la expresión de la COX-2 (Mitchell 2008). Adicionalmente, en nuestro laboratorio hemos demostrado que tanto la AEA como el NO son factores cruciales en el control de los niveles de prostaglandinas (Cella 2010, Aisemberg 2010).

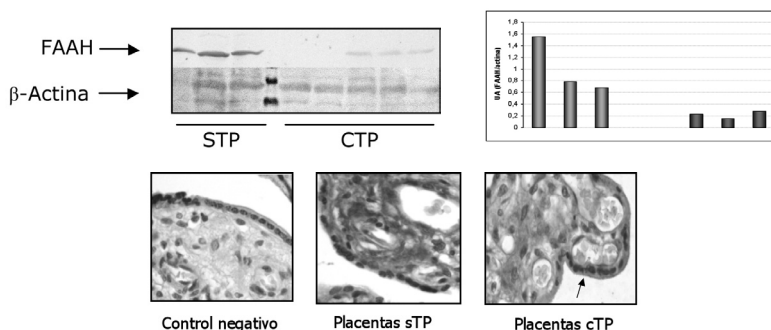
Hasta el momento se desconoce cual es el mecanismo del efecto tóxico de la AEA sobre la preñez y no se ha evaluado la posibilidad de que el sistema de endocannabinoides pueda modular mediadores como el NO y las PGs, sustancias claves en el crecimiento y desarrollo fetal. Por lo tanto, el objetivo general del presente trabajo fue investigar la participación del sistema de endocannabinoides (AEA/CBs/FAAH) como modulador del sistema nitrérgico y la producción de prostaglandinas en placenta humana.

En primer lugar investigamos la expresión de los distintos componentes del sistema endocannabinoide en explantos de vellosidades coriónicas provenientes de placentas obtenidas de mujeres con embarazos sin complicaciones, luego de cesáreas electivas (placentas sin trabajo de parto, STP) o partos vaginales (placentas con trabajo de parto, CTP) a término de la gestación (38-40 semanas).

Por western blot detectamos una banda de 52kDa correspondiente a la enzima NAPE-PLD, considerada como la principal fuente de síntesis de AEA. Los resultados obtenidos demuestran que no se observan diferencias significativas en la expresión proteica de la enzima cuando se comparan los explantos obtenidos de placentas STP y CTP al término de la gestación. Por inmunohistoquímica observamos que la inmunomarcación de NAPE se localiza principalmente en el mesénquima de las vellosidades así como también en el sincitiotrofoblasto.



Adicionalmente, investigamos la expresión proteica de la hidrolasa de amidas de ácidos grasos (FAAH), encargada de la degradación de AEA y considerada enzima clave en el control de los niveles del endocannabinoide.

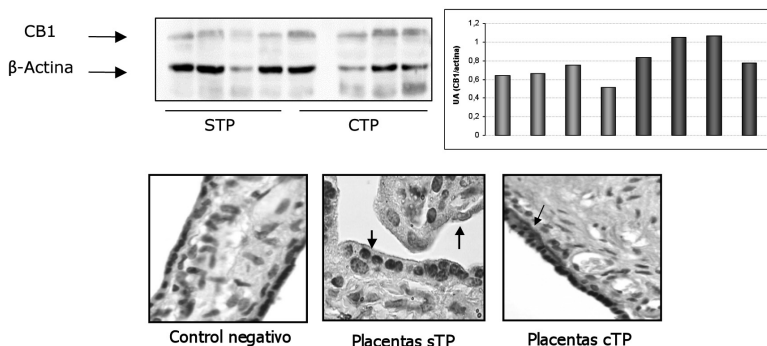


Observamos que los explantos provenientes de mujeres con trabajo de parto expresan menores niveles proteicos de FAAH que aquellos obtenidos de mujeres sometidas a cesáreas (STP).

Cuando analizamos su localización por inmunohistoquímica observamos que la marca se localiza principalmente en el mesénquima y en la membrana apical del sincitiotrofoblasto, siendo más intensa en las placentas sTP con respecto a la observada en las placentas cTP.

En el año 2003 Park y colaboradores detectaron inmunomarcación positiva para CB1 y FAAH en placenta humana a término. Nuestro siguiente objetivo fue investigar la expresión del receptor CB1 en placentas con y sin trabajo de parto a término.

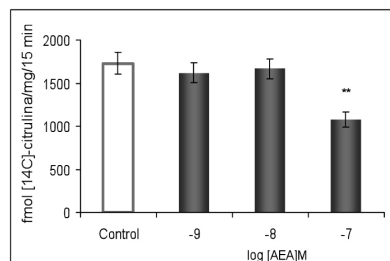
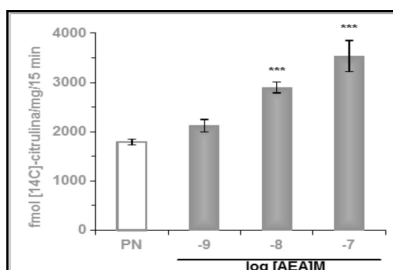
Los resultados obtenidos demuestran que el receptor CB1 se expresa de manera similar en ambos tipos de explantos analizados. Adicionalmente investigamos su localización por inmunohistoquímica y detectamos inmunomarcación positiva en la membrana apical del sincitiotrofoblasto en placentas sin trabajo de parto, mientras que la inmunomarcación fue mas intensa en la membrana basal en el caso de las placentas provenientes de mujeres con trabajo de parto.



El óxido nítrico (NO) es un potente vasodilatador de la vasculatura placentar ya que mantiene el tono basal y atenúa el efecto de vasoconstrictores. El NO es un radical libre gaseoso que se sintetiza por la acción de la óxido nítrico sintasa (NOS). La NOS puede ser modulada por diversos factores entre los cuales se encuentra la AEA.

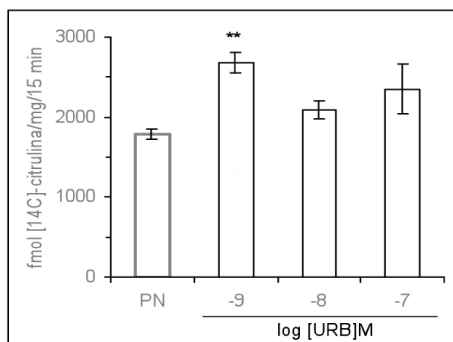
Los resultados obtenidos por nuestro laboratorio sugerían que la AEA era capaz de modular los niveles de NO en diversos sistemas (Cella, 2008). Por ello nuestro siguiente objetivo fue analizar la participación de la AEA en la modulación del sistema nitrérgico en placenta humana. Se realizó una curva

concentración-respuesta y en el tiempo del efecto de AEA sobre la actividad de NOS en placentas sTP y cTP.

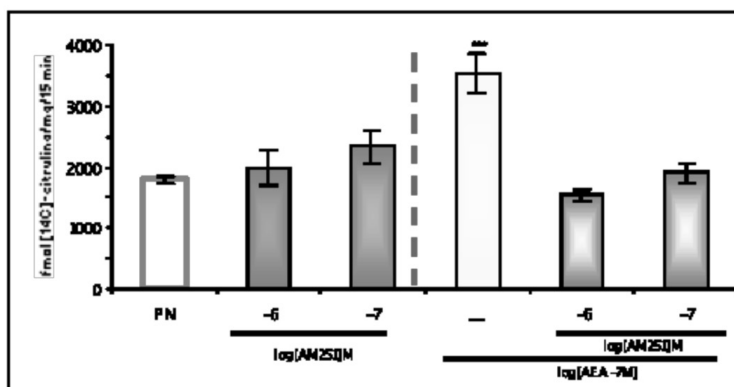


Observamos que la AEA fue capaz de modular la actividad de la NOS en el rango de concentraciones de 10 a 100 nanomolar, cuando los explantos de placenta humana fueron incubados durante media hora. Como podemos observar, la AEA provocó un incremento de la actividad de la NOS sobre vellosidades coriónicas provenientes de placentas sin trabajo de parto; mientras que disminuyó la actividad de la NOS cuando los explantos placentarios fueron obtenidos de mujeres CTP. Este efecto diferencial de la AEA sobre la actividad de la NOS podría deberse a una expresión diferencial de los receptores de cannabinoides (CB1 y CB2) en las placentas analizadas.

Adicionalmente, investigamos el efecto de la AEA endógena sobre la actividad de NOS. Para ello se cultivaron explantos de vellosidades coriónicas de placentas STP con URB-597, un inhibidor selectivo de la FAAH y se determinó la actividad de NOS.



Coincidentemente, observamos que cuando los explantos de placenta humana fueron incubados con URB-597 en concentraciones nanomolares, este inhibidor selectivo de la FAAH provocó un incremento en la actividad de la NOS similar a lo observado cuando incubamos los explantos con AEA exógena.



Luego, investigamos la participación del receptor CB1 en el efecto de la AEA sobre la actividad de la NOS. Para ello incubamos los explantos de placenta a término con dos concentraciones del antagonista del receptor CB1, AM251 (10⁻⁶ y 10⁻⁷M). Cuando los explantos fueron co-incubados con AEA y AM251, demostramos que el antagonista selectivo de CB1 revirtió el efecto estimulatorio del endocannabinoide sobre la actividad de la NOS.

Las prostaglandinas (PGs) se sintetizan a partir del ácido araquidónico (AA) de las membranas celulares por acción de la ciclooxigenasa (COX) y son rápidamente metabolizadas por la 15 hidroxiprostaglandina dehidrogenasa (PGDH). Hacia el final de la gestación, la producción de las PGs se incrementa significativamente en la unidad feto-placentaria. Por otro lado, en los últimos años se ha demostrado que los niveles plasmáticos de AEA se incrementan más de 4 veces en las mujeres que presentan trabajo de parto a término con respecto a las que sufren cesárea (Habayeb y col, 2004).

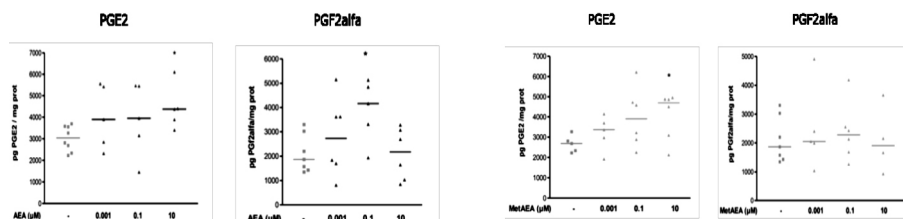
Nuestro objetivo fue investigar la participación de la AEA en la regulación del sistema prostanoide en placenta humana.

Para evaluar si AEA modifica la síntesis de prostaglandinas en las placentas humanas, se cuantificó por radioinmunoanálisis (RIA) los niveles de PGE2, un importante vasodilatador y anticoagulante placentario y la liberación de PGF2alfa, un primordial vasoconstrictor, en placentas de mujeres con y sin trabajo de parto a término.

Para ello muestras de placenta sTP y cTP fueron estabilizados durante 1h en medio RPMI 1640 en estufa a 37°C con 5% de CO2. Luego los explantos fueron incubados con distintas concentraciones de AEA o meta-AEA

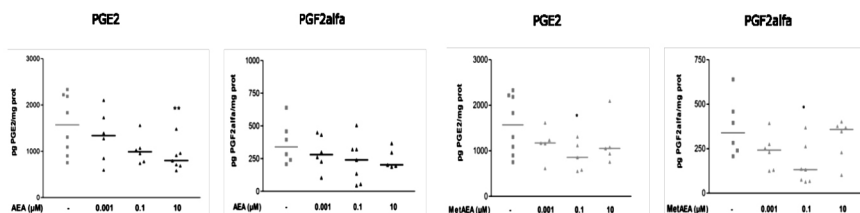
(análogo no hidrolizable de AEA) durante 24hs, y posteriormente cuantificamos los niveles de prostaglandina E2 y F2 α en el sobrenadante de cultivo.

Placentas cTP



Los datos obtenidos demuestran que la AEA estimula la producción de prostaglandinas cuando las placentas provienen de mujeres con trabajo de parto.

Placentas sTP



La AEA causó una disminución de los niveles de PGE2 y PGF2 α en explantos placentarios obtenidos de mujeres sin trabajo de parto.

Para confirmar los resultados obtenidos investigamos el efecto de la meta-AEA, un análogo no hidrolizable de la AEA, con el fin de descartar que el efecto observado sobre los niveles de prostaglandinas pudiera tener relación con una mayor fuente de ácido araquidónico producto de la degradación de la AEA por la FAAH. Observamos que la meta-AEA incrementó los niveles de PGE2 mientras que no modificó los niveles de PGF2 α . Estos resultados demuestran que la AEA regula diferencialmente los niveles de prostaglandinas en placentas sTP y cTP.

Para investigar si la AEA modula la expresión proteica de las enzimas involucradas en la síntesis y degradación de las prostaglandinas incubamos explantos de placentas sTP con diferentes concentraciones de la AEA durante 2 horas. Posteriormente los tejidos fueron colectados, homogenizados y sonicados en medio con inhibidores y la expresión proteica de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y la PGDH, la enzima responsable del catabolismo de las PGs, fueron analizadas por western blot.

Los resultados demuestran que la AEA, en concentraciones fisiológicas (nanomolares), provoca una disminución en la expresión proteica de la COX-2, principal isoforma involucrada en la síntesis de prostaglandinas. Por otro lado observamos un incremento en la expresión proteica de PGDH, lo cual favorecería el catabolismo de las prostaglandinas.

En conjunto, los resultados obtenidos en la presente investigación demuestran que el sistema endocannabinoide se expresa diferencialmente en placentas con y sin trabajo de parto, y que los endocannabinoides pueden funcionar como una señal dado que son capaces de modular la producción de NO y prostaglandinas en la placenta humana.

Demostramos que la AEA incrementa la síntesis de prostaglandinas mientras que disminuye la producción de NO en placentas cTP, mientras que disminuye la producción de prostaglandinas e incrementa la actividad de la NOS en placentas sTP, regulando de esta manera la síntesis de moléculas claves que contribuyen al inicio del trabajo de parto a término.

REFERENCIAS

1. Aisemberg J, Vercelli C, Wolfson M, Salazar AI, Osycka-Salut C, Billi S, Ribeiro ML, Farina M, Franchi AM. Inflammatory agents involved in septic miscarriage. *Neuroimmunomodulation*. 2010;17(3):150-2.
2. Cella M, Farina MG, Dominguez Rubio AP, Di Girolamo G, Ribeiro ML, Franchi AM. Dual effect of nitric oxide on uterine prostaglandin synthesis in a murine model of preterm labour. *Br J Pharmacol*. 2010 Oct;161(4):844-55.
3. Cella M, Leguizamón GF, Sordelli MS, Cervini M, Guadagnoli T, Ribeiro ML, Franchi AM, Farina MG. Dual effect of anandamide on rat placenta nitric oxide synthesis. *Placenta*. 2008 Aug;29(8):699-707.
4. Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC,

- Piomelli D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 1994 372(6507):686-91.
5. Frank DA, Bauchner H, Parker S, Huber AM, Kyei-Aboagye K, Cabral H, Zukerman B. Neonatal body proportionality and body composition after in utero exposure to cocaine and marijuana (1990). *The J. Pediatr* 117(4):622-6.
 6. Gervasi MG, Rapanelli M, Ribeiro ML, Farina M, Billi S, Franchi AM, Perez Martinez S. The endocannabinoid system in bull sperm and bovine oviductal epithelium: role of anandamide in sperm-oviduct interaction. *Reproduction*. 2009 Mar;137(3):403-14.
 7. Gibson GT, Baghurst PA, Colley DP. (1983). *Aus and NZ J Obstet and Gynaecol* 23(1):15-9.
 8. Habayeb OM, Taylor AH, Bell SC, Taylor DJ, Konje JC. Expression of the endocannabinoid system in human first trimester placenta and its role in trophoblast proliferation. *Endocrinology*. 2008 Oct;149(10):5052-60.
 9. Habayeb OM, Taylor AH, Evans MD, Cooke MS, Taylor DJ, Bell SC, Konje JC. Plasma levels of the endocannabinoid anandamide in women--a potential role in pregnancy maintenance and labor? *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 89(11):5482-7.
 10. Kenney SP, Kekuda R, Prasad PD, Leibach FH, Devoe LD & Ganapathy V. Cannabinoid receptors and their role in the regulation of the serotonin transporter in human placenta. (1999) *Am. J. Obstet Gynecol*, 181, 491-497.
 11. Maccarrone M, Bisogno T, Valensise H, Lazzarin N, Fezza F, Manna C, Di Marzo V, Finazzi-Agro A. Low fatty acid amide hydrolase and high anandamide levels are associated with failure to achieve an ongoing pregnancy after IVF and embryo transfer. *Mol Hum Reprod* 2002, 8:188-195.
 12. Maccarrone M. Endocannabinoids: friends and foes of reproduction. *Prog Lipid Res*. 2009 Nov;48(6):344-54.
 13. Marczylo TH, Lam PM, Amoako AA, Konje JC. Anandamide levels in human female reproductive tissues: solid-phase extraction and measurement by ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Biochem*. 2010 May 15;400(2):155-62.
 14. Mitchell MD, Sato TA, Wang A, Keelan JA, Ponnampalam AP, Glass M. Cannabinoids stimulate prostaglandin production by human gestational tissues through a tissue- and CB1-receptor-specific mechanism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008 Feb;294(2):E352-6.
 15. Park B, Gibbons M, Mitchell MD and Glass M. Identification of the CB1

- cannabinoid receptor and fatty acid amide hydrolase (FAAH) in the human placenta. (2003) *Placenta* 24(10), 990-995.
16. Ueda N, Kurahashi Y, Yamamoto S, Tokunaga T. Partial purification and characterization of the porcine brain enzyme hydrolyzing and synthesizing anandamide. *J Biol Chem.* 1995 270(40):23823-7.
 17. Vercelli CA, Aisemberg J, Billi S, Cervini M, Ribeiro ML, Farina M, Franchi AM. Anandamide regulates lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthesis and tissue damage in the murine uterus. *Reprod Biomed Online.* 2009 18(6):824-31

PARTICIPACIÓN DEL POLIMORFONUCLEAR NEUTRÓFILO EN LOS MECANISMOS DE LA INMUNOSUPRESIÓN ASOCIADA A PROCESOS SÉPTICOS

Fernández Gabriela Cristina; Barrera, Gabriela

División Inmunología de la Academia Nacional de Medicina e ILEX, CONICET

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las patologías asociadas a procesos inflamatorios sistémicos se engloban en el término Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS, Systemic Inflammatory Response Syndrome), e incluyen el shock séptico, el Síndrome de Distrés Respiratorio del Adulto (ARDS), las quemaduras severas, el trauma post-quirúrgico, el shock hemorrágico o traumático y la injuria por isquemia y reperusión¹. En particular, el shock séptico es una entidad clínica heterogénea asociada a algún tipo de infección, ya sea con bacterias Gram negativas, Gram positivas u hongos. Sin embargo, aproximadamente el 50% de los casos de sepsis están asociados a la infección con bacterias Gram negativas. Los lipopolisacáridos (LPS) son glicolípidos presentes en la membrana de las bacterias Gram negativas y constituyen los más potentes inmunoestimuladores de la respuesta inflamatoria conocidos hasta el momento.

Si bien nuestro país no cuenta con datos fidedignos del impacto de la sepsis, el Grupo Argentino de Estudio, Difusión e Investigación de la Sepsis reporta que existirían 50 muertes diarias por sepsis. Datos de Estados Unidos y Europa revelan que más de 500.000 personas desarrollan sepsis por año, y la incidencia crece aproximadamente 1.5% por año⁶. El shock séptico, resulta ser la principal causa de mortalidad en las unidades de cuidados intensivos, con tasas de entre 50 y 70%. La muerte por shock séptico ha sido generalmente asociada a la respuesta inflamatoria exacerbada o desmedida que ocurre durante la primera fase del mismo. Es por eso que la mayoría de los ensayos clínicos han estado destinados a bloquear distintos mediadores inflamatorios participantes de este fenómeno. Sin embargo, todas las alternativas terapéuticas propuestas en los últimos 20 años han fracasado. Probablemente esto se deba a que seguida a la activación del

sistema inflamatorio, se desarrolla una respuesta compensatoria antiinflamatoria sistémica (CARS), que habitualmente conduce a inmunosupresión. En esta etapa los pacientes presentan una mayor susceptibilidad a contraer infecciones secundarias que pueden resultar fatales. Este proceso y los mecanismos intervinientes son mucho menos conocidos y han sido poco explorados.

Los fenómenos de “refractoriedad inmune” o inmunosupresión posteriores a la sepsis son procesos sumamente complejos e involucran mecanismos tanto celulares como humorales. Tradicionalmente, el estudio de estos mecanismos ha sido abordado a nivel experimental a través de la inducción de tolerancia a LPS, fenómeno ampliamente aceptado pero estudiado casi exclusivamente a nivel del macrófago. Dado que el neutrófilo (PMN) constituye una célula central de la respuesta innata como primera línea de defensa en cualquier infección, fallas en la respuesta del mismo durante los fenómenos de inmunosupresión representan un riesgo potencialmente letal. Por otro lado, datos recientes revelan que el PMN posee la capacidad de modular la respuesta inmune adaptativa, por lo que también podría estar participando activamente en el establecimiento y/o mantenimiento de la inmunosupresión asociada a los fenómenos sépticos.

Distintas evidencias clínicas demuestran que un grupo importante de sobrevivientes de la etapa aguda del shock séptico, presentan características compatibles con el referido estado de tolerancia. Estos pacientes poseen un mal pronóstico, ya que presentan un estado general de inmunosupresión, con una mayor susceptibilidad a contraer infecciones oportunistas de las cuales no pueden deshacerse². En estos individuos la respuesta inmune se encuentra deteriorada, los Mo presentan niveles bajos de HLA-DR y baja capacidad de presentación antigénica, y las respuestas son predominantemente de tipo Th^{23,4}.

Por lo expuesto anteriormente nuestra hipótesis de trabajo es que dado que el PMN es un componente fundamental de la respuesta innata, sus propiedades antimicrobianas podrían estar afectadas como resultado del fenómeno sistémico de inmunosupresión asociado a los procesos inflamatorios sistémicos y/o en sepsis. Por otra parte, dada la capacidad supresora descrita recientemente de células precursoras de PMN (Gr-1+ CD11b+) y dado que la movilización de células de médula ósea ha sido asociada a la inoculación de LPS, la inmunosupresión asociada a las fases tardías de la sepsis podría ser consecuencia, al menos en parte, de la interacción de estos PMN “inmunosupresores” con células de la respuesta inmune adaptativa.

Estudiando los mecanismos de la tolerancia e inmunosupresión, podríamos elucidar cómo se alteran los mecanismos normales de regulación de la respuesta inmune, que conducen a una hipo-respuesta central como mecanismo fisiopatogénico en enfermedades de alta mortalidad. Asimismo, es fundamental estudiar los mecanismos básicos de la inmunosupresión para poder planear posibles alternativas terapéuticas ya que la relevancia clínica de esta etapa es indudable, considerando que mientras que en la etapa pro-inflamatoria la mortalidad es entre 2 al 11%, el resto de las muertes (89 al 98%) ocurre en las etapas tardías del proceso séptico, cuando hay un predominio claro de citoquinas anti-inflamatorias y se observa una inmunosupresión bien definida en los pacientes⁷.

Por lo expuesto anteriormente, el objetivo general del presente proyecto será estudiar los mecanismos inflamatorios sistémicos que conducen a la inmunosupresión postsepsis, focalizándonos en el estudio del estado funcional del PMN durante estos fenómenos y su participación en el establecimiento de dicha refractariedad o inmunosupresión.

La problemática planteada se abordará utilizando el modelo murino de tolerancia a LPS, el cual reproduce en parte, la etapa de refractariedad inmune observada en los pacientes sépticos. Para ello, se implementarán esquemas de inyecciones diarias de pequeñas dosis de LPS (cuatro dosis de 5 µg, grupo Tlt). A través de este esquema los animales se vuelven resistentes a posteriores dosis del mismo estímulo (anergia específica para el LPS). Como controles se utilizaron animales a los que se les administró solución salina en vez de LPS (grupo Ctlol).

RESULTADOS

Los ratones fueron inoculados con dosis intraperitoneales (i.p.) de LPS por cuatro días consecutivos y al quinto día la expresión de la molécula de activación CD11b fue evaluada en PMN de sangre periférica por citometría de flujo. En paralelo, otro grupo de ratones recibió una dosis mayor de LPS Lp. para evaluar la up-regulación del CD11b en respuesta a un desafío (Challenge). Se observó que basalmente los PMN de los Tol tienen un mayor tamaño (FSC) que los PMN de animales Ctlol (FSC: Ctlol=517.4±15.6, Tol=575.5±20.8*, *p<0.05 vs Ctlol). Asimismo, presentaron una menor expresión del marcador CD11b (Fig 1A). En respuesta al desafío, los PMN de los animales Tlt presentaron una menor up-regulación del CD11b con respecto

de los Ctlol. Para evaluar la respuesta de estos PMN fuera del contexto, se extrajo sangre periférica y se incubó *ex vivo* con dos dosis de LPS (Fig 1B). En este caso se observó que la respuesta (fold increase del CD11b) de los PMN de los Tol se encontraba aumentada con respecto de los Ctlol. Este resultado indica que el PMN en si mismo no posee defectos en su capacidad de respuesta. Esta discrepancia entre la respuesta *in vivo* y *ex vivo* podría ser explicada si por algún motivo *in vivo* el LPS del desafío inoculado *i.p.* no llega a la periferia para activar a los PMN en los Tol. En este sentido, hemos observado que la inoculación diaria de LPS *i.p.* induce la acumulación de PMN en el lugar de inyección. Esta acumulación de células a nivel local podría impedir que el estímulo llegue a circulación. Para poner a prueba esta hipótesis, el desafío fue realizado por vía endovenosa (*e.v.*) en vez de *i.p.* En este caso, el aumento del CD11b (fold increase) en los Ctlol desafiados por las dos vías fue similar, mientras que en los Tol el desafío *c.v.* indujo una respuesta mayor (similar a lo observado *ex vivo*).

Dado que los PMN son esenciales para la protección contra infecciones, a continuación se evaluó la eliminación (clearance) de bacterias en Tol. En esta serie de experimentos los macrófagos peritoneales fueron previamente eliminados mediante dos dosis de liposomas cargados con clodronato, lográndose una depleción total de dicha población celular. Bacterias intestinales inoculadas *i.p.* fueron utilizadas como estímulo desafiante en animales en donde la generación de tolerancia se realizó de forma *c.v.* 4h más tarde se realizaron lavados peritoneales, se extrajo sangre y se utilizó MacConkey agar para evaluar las unidades formadoras de colonias (UFC) remanentes. Se observó un mayor clearance de bacterias en los Tol], medido por crecimiento de bacterias recuperadas del peritoneo (Fig. 2A). Por otra parte, quisimos determinar si el aumento en la capacidad de clearance de los Tol no se debía a un pasaje más rápido de las bacterias del peritoneo a la sangre. Sin embargo, la cantidad de bacterias recuperadas en sangre fue menor en los Tol (Fig. 2h), indicando que en realidad la resolución de la infección se realiza en el peritoneo disminuyendo la cantidad de bacteria que pasaría a la circulación. Por otra parte, cuando evaluamos la cantidad de PMN que migran al sitio de infección *in vivo* en respuesta a las bacterias, se observó un aumento en el número de PMN migrados en los Tol respecto de los Ctlol a las 4 hs post-desafío (Fig. 2C). Por lo tanto, el aumento del clearance podría estar relacionado al mayor número de PMN que migran al sitio de infección en el estado de tolerancia al LPS.

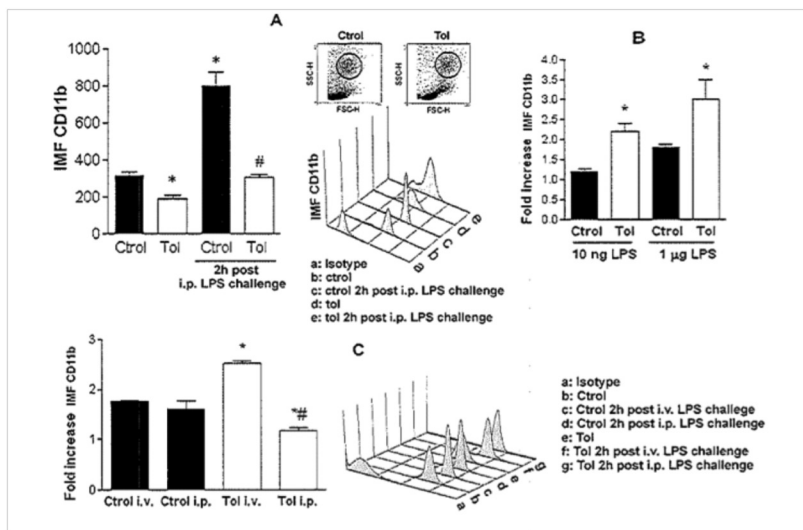


Figura 1 Activación de PMN periféricos respuesta a distintas vías de inoculación. A.- La tolerancia fue generada i.p. (4 dosis diarias de 5 g de LPS) y el challenge (100 µg de LPS) fue administrado i.p. La intensidad media de fluorescencia (IMF) del CD11b en PMN de sangre periférica fue medida por citometría de flujo antes y 2h después del challenge. 100 µl de sangre fueron incubados con el anticuerpo conjugado a FITC por 30 min. Luego de un shock osmótico para lisar los glóbulos rojos, las células fueron lavadas y resuspendidas en ISOFLOW. A la derecha se muestran un dot-plot representativo de tamaño (FSC) vs. complejidad (SSC) de un animal Ctrl y un Tol, y un histograma representativo de la expresión del CD11b (IMF) de cada grupo. $p < 0.05$ vs Ctrl, $\#p < 0.05$ vs Tol. B- 100 µl de sangre de los animales Ctrl y Tol fue extraída e incubada ex vivo con dos dosis de LPS. 2h más tarde la expresión del CD11b fue determinada y expresada como el aumento (fold increase) en la IMF antes y después de la incubación. $*p < 0.05$ vs Ctrl. C- La tolerancia fue generada por vía i.p. pero el challenge fue administrado i.p. o c.v. 2h más tarde la expresión del CD11b fue determinada y expresada como el aumento (fold increase) en la IMF antes y después del challenge. A la derecha se muestra un histograma representativo de la expresión del CD11b (IMF) de cada grupo. $*p < 0.05$ vs Ctrl respectiva vía, $\#p < 0.05$ vs Tol c.v.

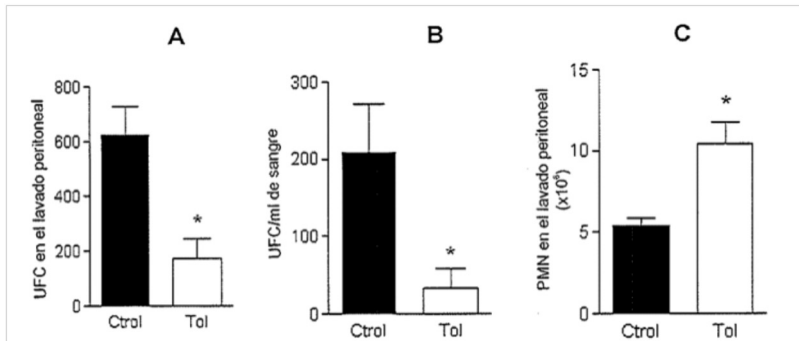


Figura 2. Capacidad de eliminar una “infección” en animales tolerantes en ausencia de macrófagos peritoneales. La tolerancia fue generada por inoculación ex. de LPS y los animales fueron desafiados con 10 bacterias intestinales por vía i.p. 4h más tarde se extrajo sangre y se realizaron lavados peritoneales. A- Las unidades formadoras de colonias (UFC) remanentes en el peritoneo se determinaron plaqueando 100 μ l del líquido peritoneal en agar MacConkey. Las placas fueron crecidas por 24 hs a 37°C. * $p < 0.05$ vs control. B- Las UFC en sangre se determinaron en 200 μ l de sangre como en B. * $p < 0.05$ vs control. C- El número de PMN en peritoneo se determinó a las 4hs post-desafío en animales Ctrl y Tol por recuento en cámara de Neubauer. * $p < 0.05$ vs Ctrl.

Para analizar la capacidad de fagocitosis in vivo de los PMN de Tol], se utilizaron bacterias *B. coli* conjugadas a FITC. La generación de tolerancia se realizó e.v, las bacterias FITC fueron inoculadas i.p. y 4 horas más tarde lavados peritoneales fueron obtenidos. Las células fueron contadas y marcadas con un anticuerpo anti-PMN (Gr-1) conjugado a PE. El % e intensidad media de fluorescencia (IMF) fueron determinadas por citometría de flujo. Mientras que el % de PMN que fagocitaron bacterias se encontró disminuido en los Tol (Fig. 3A), cuando estos datos fueron traducidos a números absolutos, la resultante fue un mayor número de PMN positivos para FITC (Fig. 3B). Por otro lado, la capacidad fagocítica de los PMN de los Tol (IMF) es similar a la de los Ctrl (Fig. 3C). Estos resultados indican que si bien no hay diferencias en la capacidad de fagocitosis de los PMN in vivo, el mayor número de células que llega al lugar de la infección se traduce en un aumento de PMN que fagocitan bacterias, explicando en parte, el mayor clearance observado en los Tol (Figura 2).

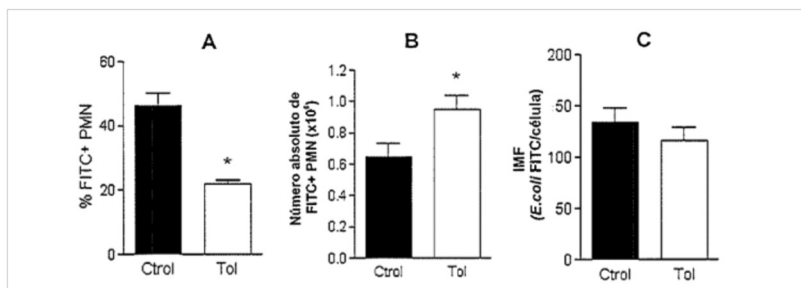


Figura 3. Fagocitosis in vivo en animales tolerantes. El Porcentaje (A) y número de PMN (B) en peritoneo se determinó a las 4h post-inoculación de las bacterias-FITC en animales Ctrl y Tol. * $p < 0.05$ vs Ctrl. La IMF, (C) que indica la cantidad de bacteria fagocitada por célula, se determinó por citometría de flujo. * $p < 0.05$ vs Ctrl.

Para explicar el mayor número de PMN que migran en respuesta a una infección se determinó el número de PMN en sangre periférica y se comparó con el pool marginal. Los PMN del pool marginal no se encuentran en circulación sino que están adheridos al endotelio vascular y pueden responder más rápidamente a un estímulo local. Como se observa en la figura 4 si bien no existen diferencias en el número de PMN periféricos entre los dos grupos, los Tol presentan un mayor número de PMN en el pool marginal.

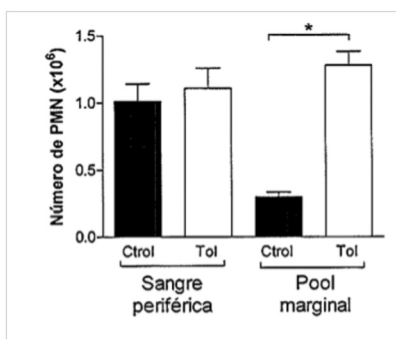


Figura 4 Número de PMN en distintos compartimentos periféricos. El número de PMN se determinó por recuento en cámara de Neubauer, en sangre periférica y en las células obtenidas por lavado exhaustivo del lecho vascular (pool marginal). * $p < 0.05$

Para investigar como influyen los PMN sobre la inmunidad de otras células investigamos la presencia de las células Gr-1 (precursores de PMN) en órganos linfáticos secundarios. Ha sido reportado el aumento de esta población de precursores mieloides con características inmunosupresoras en distintos contextos infecciosos y en tumores. Estas células, poseen los marcadores Gr-1 y CD11b. Como se muestra en la figura 5, los Tol presentan un aumento de células mieloides inmaduras Gr-1+ CD11b+ (Fig. 5A) en bazo y ganglio. En concordancia con estos hechos, los Tol presentaron una disminución en la proliferación de células T en ganglio y bazo utilizando anti-CD3 adherido a placa y revelando con el ensayo de MTT (Fig 5B). Asimismo, también observamos que la médula ósea de Tol (fuente de precursores) ejerció una inhibición dependiente de contacto (experimentos de *transwell*), sobre linfocitos normales (Fig. 5C), mientras que los PMN periféricos de Tol no poseen la capacidad de inhibir la proliferación T (no mostrado).

CONCLUSIONES

La respuesta de PMN periférica en animales tolerantes es dependiente de la vía de administración del desafío. Es decir, si bien los PMN per se responden de forma exacerbada cuando el estímulo es administrado directamente (ex vivo o desafío c.v.), la acumulación de células en el lugar de generación de la tolerancia impide la llegada del estímulo desafiante a circulación. Este mecanismo sería una adaptación del estado de tolerancia para impedir el posible daño tisular que generaría la activación desmedida de los PMN periféricos. Las células acumuladas localmente estarían actuando como scavenger del estímulo activador.

Por otra parte, en el estado de tolerancia a LPS observamos que los PMN poseen una capacidad mayor de migrar a un sitio infeccioso in vivo, relacionado con un mayor número de PMN presentes en el pool marginal. Asimismo, los animales tolerantes poseen una mayor capacidad para eliminar una infección (clearance) mediada por PMN. Esto no se debe a un aumento de la capacidad fagocítica de los PMN en si misma, sino que el aumento en el número de PMN presentes se traduce en un aumento del clearance.

Si bien no parece haber defectos en la respuesta de los PMN en el estado de tolerancia, la respuesta adaptativa se encuentra alterada (menor proliferación 'I'). Esto puede correlacionarse con la presencia en órganos linfáticos secundarios de una población de precursores mieloides con propiedades inmunosupresoras en los animales tolerantes.

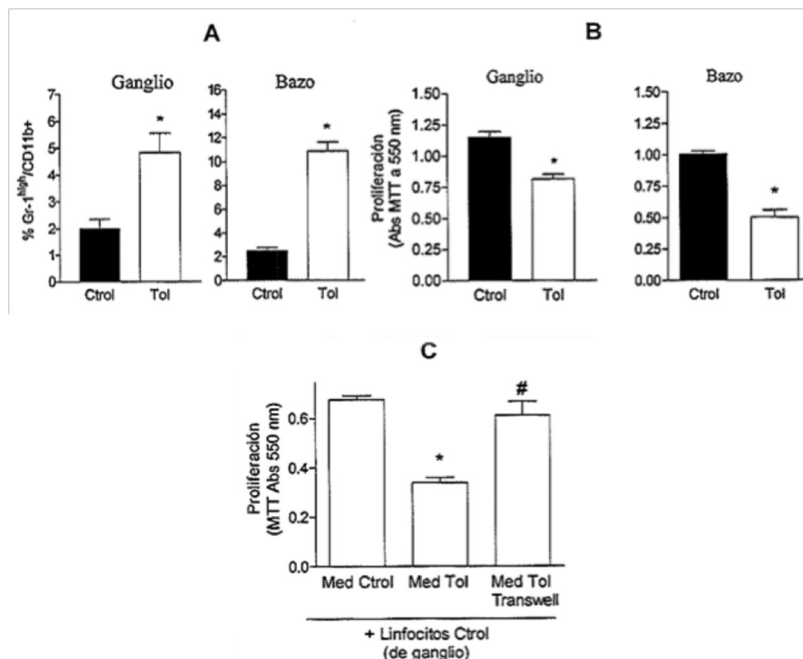


Figura 5. Influencia de precursores mieloides en la proliferación T de animales tolerantes. A- Los ganglios y bazo fueron procesados y la suspensión celular obtenida incubada con anticuerpos específicos anti-Gr-1 y CD11b. El % de células positivas para estos marcadores fue obtenido por citometría de flujo. B- 0.2×10^6 células de ganglio o bazo fueron incubadas por 72 h en una placa de 96 wells en la cual previamente se le había adherido un anti-CD3 (estímulo para proliferación de células T). Luego el colorante MTT fue agregado por 4 h y los cristales formados en las células en proliferación disueltos con DMSO. La absorbancia resultante (550 nm) fue medida. C- 0.2×10^6 células obtenidas de médula ósea fueron co-incubadas con 0.2×10^6 células de ganglio de animales normales (no tratados). La proliferación fue ensayada como en B. También se impidió el contacto entre las células de médula ósea y los linfocitos T utilizando un ensayo de transwell. $p < 0.05$ vs med Ctrol, $^{**}p < 0.05$ vs med Tol.

RESUMEN

La sepsis se caracteriza por una inflamación sistémica inicial exagerada, seguida por un estado generalizado de inmunosupresión, a veces mortal. Esta fase puede reproducirse experimentalmente mediante el modelo de tolerancia de LPS, donde repetidas bajas concentraciones de LPS generan

un estado refractario hacia sus efectos. Los neutrófilos (PMN) son centrales en la respuesta contra agentes infecciosos. Como defectos en las respuestas de los PMN durante las etapas finales de la sepsis pueden contribuir a la sensibilidad de los pacientes para adquirir infecciones oportunistas, nuestro objetivo fue investigar el estado funcional y fenotípico de los PMN en el modelo de tolerancia a LPS. Para ello, determinamos los efectos del LPS en la activación de los PMN. Además, investigamos la capacidad *in vivo* de los PMN para eliminar una infección polimicrobial local en ausencia de macrófagos locales. También se determinó la capacidad fagocítica de los PMN utilizando bacterias conjugadas a FITC. Descubrimos que la activación de los PMN periféricos era estrictamente dependiente del sitio de administración del desafío. Cuando la tolerancia se generó por inoculación intraperitoneal de LPS, una acumulación local de PMN impidió que el desafío intraperitoneal llegara a la circulación, por lo tanto los PMN periféricos fueron pobremente activados. Sin embargo, cuando se realizó el desafío *ex vivo* o *e.v.* la activación de los PMN fue mayor a la de ratones control. Además, a pesar de una actividad fagocítica conservada en los PMN tolerante, la eliminación de una infección de polimicrobial inducida localmente fue más eficiente en el estado tolerante tanto en presencia o ausencia de los macrófagos locales. Esto se relacionó con un mayor número de PMN presentes en el pool marginal que rápidamente migran al sitio infeccioso traduciéndose un aumento del número de este tipo celular a nivel local. Aunque los PMN no muestran ningún defecto en su respuesta, la respuesta adaptativa se encontró alterada en los ratones tolerantes, como se ha demostrado por una disminución de la proliferación de células. Esto se asoció con la presencia de células mieloide supresoras en órganos linfáticos secundarios.

ABSTRACT

The sepsis syndrome is characterized by an initial systemic exaggerated inflammation, followed by generalized state of immune-suppression, sometimes life-threatening. This phase can be experimentally reproduced using the model of LPS tolerance, where repetitive low concentrations of LPS generate a refractory state towards its effects. Neutrophils (PMN) are central in the response against infectious agents. As defects in PMN responses during late stages of sepsis may contribute to the sensibility of patients to acquire opportunistic infections, our aim was to investigate the phenotypic and functional state of PMN in the model of tolerance to LPS. For this purpose, we determine the LPS effects on PMN activation. Additionally, we investigated

the *in vivo* capacity of PMN to eliminate a local polymicrobial infection in the absence of local macrophages. We also determined the phagocytic capacity of PMN using FITC-bacteria. We found that the activation of peripheral PMN was strictly dependent on the site of challenge administration. When tolerance was generated by *i.p.* inoculation of LPS, a local accumulation of PMN prevents that the *i.p.* challenge reach the circulation, hence peripheral PMN were poorly activated. However, when the challenge was performed *ex vivo* or *i.v.* the activation of PMN was higher than for control mice. Additionally, despite a conserved phagocytic activity in tolerant PMN, the elimination of a locally induced polymicrobial infection was more efficient in the tolerant state both in the presence or absence of local macrophages. This was related to a higher number of PMN present in the marginal pool that rapidly cause an increase migration of this cell type to the infectious site in tolerant mice. Although PMN do not show any defect in their response, the adaptive response was altered in tolerant mice, as demonstrated by a decreased T cell proliferation. This was associated with an increase presence of myeloid suppressor cells in secondary lymphatic organs.

REFERENCIAS

1. Bone RC. Why new definitions of sepsis and organ failure are needed. *Am J Med.* 1993;95:348-350.
2. Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med.* 1996;24:1125-1128.
3. Docke WD, Randow F, Syrbe U, et al. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment *Nat Med.* 1997;3:678-681.
4. Muller Kobold AC, Tulleken JE, Zijlstra JG, et al. Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Med.* 2000;26:883-892
5. Natanson C, Hoffman WD, Saffredini AF, Eichacker PQ, Danner RL. Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis. *Ann Intern Med.* 1994;120:771-783.
6. Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med.* 2003;9:517-524.
7. Efron P. Moldawer LL. Sepsis and the dendritic cell. *Shock.* 2003;20:386-401.



INTERACCIONES NEURO-INMUNO-ENDÓCRINAS EN EL TESTÍCULO

Rossi, Soledad Paola^a; Matzkin, María Eugenia^{a,b}; Terradas, Claudio^{c,d};
Ponzio, Roberto^e; Puigdomenech, Elisa^d; Levalle, Oscar^c; Calandra,
Ricardo Saúl^a; Frungieri, Mónica Beatriz ^{a,b}

^aLaboratorio de Esteroides, Instituto de Biología y Medicina Experimental, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Buenos Aires, Argentina;

^bFacultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina;

^cDivisión de Endocrinología, Hospital Durand, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina; ^dInstituto Médico PREFER, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina; ^eInstituto de

Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

RESUMEN

Previamente, hemos descripto que la melatonina a través de receptores mel1a, inhibe la expresión de la proteína de regulación aguda de la esteroidogénesis (StAR), enzimas esteroidogénicas claves y la producción de testosterona en el testículo del hámster Dorado. Dicha rol inhibitorio ejercido por melatonina sobre el proceso esteroidogénico testicular sería mediado por la hormona liberadora de corticotrofina (CRH) y receptores CRHR1 (Frungieri y col., Endocrinology 146:1541, 2005).

El objetivo del presente trabajo ha sido investigar la/s vía/s de señalización intracelular/es asociadas a la acción de melatonina/CRH en células de Leydig del hámster. Para ello, a partir de hámsteres Dorados adultos machos mantenidos en fotoperíodo normal (14hs de luz/día), o expuestos a un fotoperíodo corto (6hs de luz/día) durante 16 semanas a fin de alcanzar la fase de máxima regresión testicular foto-inducida, se disecaron los testículos y purificaron las células de Leydig en un gradiente discontinuo de Percoll. Dichas células fueron posteriormente tratadas con melatonina o CRH determinándose, mediante ensayos de Western blot, los niveles de expresión de fosfo-erk1/2, fosfo-P38 y fosfo-jnk1/2.

Melatonina y CRH inhibieron significativamente la fosforilación de erk1/2 y jnk1/2. Melatonina también afectó la expresión de fosfo-P38 mientras que, CRH no tuvo efecto.

Además, la incubación de células de Leydig en presencia de inhibidores de las vías de señalización de erk (U0126) y jnk (SP600125) redujo la expresión de StAR y la producción basal de testosterona, indicando que estas vías modularían la síntesis de andrógenos en el testículo del hámster.

Por otra parte, el agregado de melatonina a células de Leydig incubadas en presencia de un inhibidor de **fosfatasa**s de tirosinas, el ortovanadato sódico, redujo la fosforilación de erk y jnk, la expresión de StAR y la producción de testosterona. En cambio, melatonina no afectó dichos parámetros en presencia del ácido okadaico, un inhibidor de fosfatasa de serinas/treoninas.

En conclusión, este trabajo describe un efecto modulador negativo ejercido por el sistema melatonina/CRH sobre la fosforilación de erk y jnk, y la expresión de StAR, que mediaría la inhibición de la síntesis de testosterona desencadenada por este sistema en células de Leydig del hámster.

ABSTRACT

We have previously described that melatonin, a pineal gland product, inhibits testosterone production in hamster testes via melatonin subtype 1a receptors and the local corticotrophin-releasing hormone (CRH) system (Endocrinology 146: 1541, 2005). This study attempted to determine the initial events of the melatonin/CRH signaling pathway.

In Leydig cells from reproductively active Syrian hamsters, we demonstrated that both melatonin and CRH activate tyrosine phosphatases and subsequently reduce the phosphorylation levels of erk and jnk, down-regulate the expression of StAR, and inhibit the production of testosterone. These effects were prevented by a highly selective CRH antagonist, indicating that melatonin does not exert a direct role. Furthermore, specific MEK and jnk blockers inhibited expression of StAR and the production of testosterone, confirming that these are events triggered downstream of erk and jnk.

By an **enzyme**-linked immunosorbent assay, we determined the concentration of melatonin not only in hamster testes but also in testicular biopsies of infertile men.

Melatonin concentration in human testes showed negative correlation coefficient (r) values with the overall testicular CD68-immunoreactive macrophage (MAC) number, as well as with the number of MAC located in the interstitium, tubular wall and tubular lumen. Testicular melatonin levels also showed an inverse correlation with the expression of TNF α and the prolifer-

ating cell nuclear antigen (PCNA). Using laser capture microdissection and RT-PCR, we confirmed the expression of TNF α and its receptor TNF-R1 in testicular MAC of infertile patients.

Furthermore, our studies designed in the THP-1 MAC cell line suggest that melatonin could exert an antiproliferative effect on testicular MAC and participates in the modulation of inflammatory status in infertile men.

In summary, our study identifies crucial intracellular events triggered by melatonin/CRH in the testis that lead to a down-regulation of the steroidogenic process and allow us to conjecture about the relevance of melatonin in human fertility disorders.



FISIOPATOLOGÍA DE LA SEPSIS POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*: ROL DE LAS CASCADAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR INDUCIDAS POR LA INTERACCIÓN DE LA PROTEÍNA A CON EL RECEPTOR DE TNF-A.

Constanza Gai^{1,2}, Ailin Garofalo¹, Cintia González^{1,2}, Marisa I. Gómez^{1,2}.

¹Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina; ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina.

INTRODUCCION

Staphylococcus aureus es un patógeno de gran importancia médica causal de infecciones con alta morbi-mortalidad en individuos hospitalizados y de la comunidad. El incremento en cepas resistentes a los antibióticos a nivel mundial hace que las infecciones estafilocócicas sean muy difíciles de tratar y erradicar lo cual constituye una gran preocupación a nivel de salud pública (Lowy FD, 2007).

Entre los múltiples factores que determinan la patogenicidad de *S. aureus*, la proteína A (SpA) es una proteína de superficie que actúa como un factor de virulencia extremadamente complejo ya que contribuye a la patogenicidad de las infecciones estafilocócicas mediante la inducción de respuesta inflamatoria e interfiriendo a la vez con la respuesta inmune del hospedero. La proteína A une inmunoglobulina G evitando la opsonofagocitosis (Moks et al., 1986; Foster, 2005), activa plaquetas por la unión al factor Von Willebrand (Hartleib et al., 2000), induce proliferación de células B (Sasso et al., 1989; Silverman et al., 2006) y es un factor clave en la inducción de respuesta inflamatoria en células epiteliales mediante la capacidad de interactuar con el receptor de TNF de tipo 1 (TNFR1). La interacción de la proteína A con TNFR1 conduce a la producción de IL-8 por células epiteliales y al reclutamiento de neutrófilos a pulmón y es crítica para el desarrollo de neumonía (Gómez et al. 2004).

La cascada de señalización de TNFR1 en respuesta a su ligando natural TNF- α es crítica para la eliminación bacteriana en diversos modelos experimentales (Abraham et al., 1998). TNF- α es sintetizado en respuesta a diversos estímulos como una proteína unida a la membrana celular y es liberado al medio extracelular por la acción de las proteasas ADAM17, MMP7 y PR3

(Garton et al., 2006). Los mecanismos de señalización intracelular inducidos a través de la unión del TNF- α con su receptor TNFR1 se encuentran regulados por la disponibilidad del receptor en la superficie celular. La abundancia de TNFR1 está controlada positivamente en respuesta a diversos estímulos mediante su movilización desde compartimentos intracelulares y negativamente mediante el clivaje de la superficie celular (Xanthoulea et al., 2004; Bell et al., 2007). Este último proceso, conocido como shedding, también depende de la actividad de ADAM17, enzima encargada del clivaje del dominio extracelular de TNFR1 (Reddy et al., 2000), disminuyendo la cantidad de receptor disponible para responder al ligando y finalizando la señalización a través de TNFR1. Se ha demostrado que la proteína A de *S. aureus* no sólo interacciona con TNFR1 sino que además regula la disponibilidad del receptor mediante la activación de ADAM17 en células epiteliales (Gomez et al., 2007).

ADAM17 está involucrada en el shedding de 76 factores de crecimiento, citoquinas, receptores de citoquinas y moléculas de adhesión (Scheller et al., 2011). La capacidad de ADAM17 de clivar un alto número de moléculas, sugiere que su actividad in vivo se encuentra cuidadosamente regulada durante los diversos procesos biológicos y en respuesta a diferentes estímulos. Esta enzima es una molécula clave en la regulación de la cascada de señalización de TNF- α -TNFR1 dado que regula la disponibilidad del ligando TNF- α y su receptor TNFR1. La capacidad de la proteína A de activar ADAM17 en células epiteliales, nos permitió hipotetizar que procesos similares ocurrirían en monocitos y macrófagos principales células productoras de TNF- α y componentes clave en orquestrar las respuestas inducidas por dicha citoquina.

METODOS

Cepas bacterianas, medios de cultivo y proteínas recombinantes. *S. aureus* cepa Newman y la mutante isogénica *spa*- fueron crecidas en agar tripticasa de soja; *E. coli* se creció en medio LB. Las bacterias fueron resuspendidas a una concentración de 10^9 UFC/ml. *Lactococcus lactis* se creció en medio M17 con el agregado de glucosa a 30°C sin agitación y se resuspendió a una concentración de 5×10^8 UFC/ml. La proteína A recombinante fusionada a GST fue purificada como se describió anteriormente (Gómez et al., 2006).

Cultivos celulares. La línea celular Raw (macrófagos de ratón) fue crecida en medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco), piruvato de sodio (Sigma), aminoácidos no esenciales (Gibco) y glutamax (Gibco). Veinticuatro horas antes de las estimulaciones se cambió el medio de cultivo por medio sin suero fetal bovino.

Citometría de flujo. Se utilizó un anticuerpos primarios específicos anti-TACE (Santa Cruz) y anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 488 para medir la expresión de TACE en la superficie celular mediante citometría de flujo (Gómez et al., 2007).

Modelo de infección sistémica. Los experimentos in vivo se llevaron a cabo utilizando ratones hembras de la cepa Balb/c de 6 semanas de edad. Los ratones fueron inoculados 0,125 nmoles/gr de proteína A en un volumen de 200µl siguiendo el modelo de shock por LPS (Sha et al., 2007) o una dosis subletal 2×10^8 UFC/ml de las cepas isogénicas *S. aureus* Newman y *spa*-que expresan o no proteína A, respectivamente. Grupos de animales fueron sacrificados 2 o 4 horas luego de la inoculación. Previamente se obtuvo suero por punción del plexo retro-orbital con capilares heparinizados. Se realizaron lavados peritoneales para la detección de citoquinas y la obtención de células para su posterior estudio.

ELISA. La presencia de citoquinas y receptores solubles en suero, lavados peritoneales o sobrenadante de cultivo se determinó por ELISA con pares de anticuerpos para TNF- α o TNFR1 (R&D Systems).

RT-PCR de Tiempo Real. Se obtuvo el ARN total a partir de células de peritoneo utilizando RNAeasy (Qiagen) y se sintetizó el ADNc a partir de 1 µg de ARN utilizando el kit de síntesis de cDNA Bio-Rad. Se determinaron los niveles de expresión de ARNm para TNF- α por RT-PCR de Tiempo Real. Las muestras fueron normalizadas utilizando b-actina.

Consideraciones estadísticas. Las muestras con distribución normal fueron analizadas con el Test *t* de Student y las que no presentaban distribución normal se analizaron con el test de Wilcoxon para muestras pareadas del programa Graphpad Prism.

RESULTADOS

La proteína A de *S. aureus* induce el shedding temprano de TNFR1 en macrófagos. Se determinó la expresión de TNF- α y el shedding de su receptor TNFR1 en respuesta al estímulo con *S. aureus* en macrófagos. *S. aureus*

indujo la producción de TNF- α 2 horas luego de la estimulación, respuesta que fue dependiente de la proteína A como se demostró utilizando una mutante que no expresa SpA (Figura 1A). Interesantemente, el shedding de TNFR1 ocurrió tan pronto como 30 min luego de la estimulación con *S. aureus* y fue marcadamente dependiente de la expresión de SpA (Figura 1B). El shedding temprano de TNFR1 no se observó cuando se estimularon macrófagos con una dosis equivalente de *Escherichia coli* (Figura 1B, inserto). El rol de la proteína A en la inducción de TNF- α y la aparición temprana de TNFR1 soluble fue confirmado utilizando *Lactococcus lactis* que expresa SpA en su superficie. En forma similar a lo observado con *S. aureus*, *L. lactis*-SpA indujo el shedding de TNFR1 el cual precedió a la producción de TNF- α (Figura 1C, 1D).

La interacción de la proteína A con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) media la producción de TNF- α y TNFR1 soluble. Nuestro grupo de investigación ha demostrado previamente que la interacción de la proteína A con el receptor EGFR media la activación de ADAM17 y el shedding de TNFR1 en células epiteliales respiratorias (Gomez et al., 2007). ADAM17 se expresa en forma abundante en la superficie de macrófagos (Figura 2A) y no se observó mayor movilización en respuesta a la proteína A (Figura 2B). Se determinó si la región amino terminal de la proteína A, que se sabe interacciona con EGFR, estaba involucrada en la producción de TNF- α y TNFR1 soluble en macrófagos. Se observó producción de TNF- α y shedding de TNFR1 en células estimuladas con proteínas de fusión correspondientes al extremo amino terminal mientras que no se observó respuesta en presencia de proteínas recombinantes correspondientes al extremo carboxi terminal (Figura 2C, 2D). La interacción de la Leucina 17 de los dominios conservados de la proteína A (región amino-terminal) es crítica para el reconocimiento de la proteína A por EGFR y la activación de ADAM17 en células epiteliales (Gomez et al., 200). Por lo tanto, se estableció la importancia de la señalización por EGFR en la producción de TNF- α y TNFR1 soluble mediante el uso de una mutante de proteína A que posee un reemplazo por alanina en la leucina 17 (SpA L17A). No se observó producción de TNF- α o receptor soluble en células estimuladas con dicha mutante (Figura 2E, 2F). Mediante ensayos utilizando inhibidores químicos de erk1/2 y PKC proteínas quinasas reguladas por EGFR que se conoce participan en la activación de TACE por fosforilación (REF), se demostró que ambas participan en la inducción del clivaje de TNFR1 en respuesta a la proteína A (Figura 2G).

La proteína A de *S. aureus* induce el shedding temprano de TNFR1 in vivo. A fin de determinar la relevancia biológica de los resultados obte-

nidos in vitro, se procedió a evaluar si la proteína A de *S. aureus* inducía el shedding TNFR1 en forma temprana in vivo. Para ello, se utilizó un modelo de inflamación en el cual grupos de ratones fueron inoculados por ruta intra-peritoneal con proteína A recombinante y se cuantificó el receptor soluble y TNF- α en suero. Se observó un aumento significativo de TNFR1 soluble en suero tan pronto como 30 min luego de la inoculación, niveles que se mantuvieron hasta las 2 horas post-inoculación (Figura 3 A-C). La proteína A indujo asimismo un aumento en la producción de TNF- α que se evidenció 1 hora luego de la inoculación (Figura 3 D-F). Estos resultados concuerdan con los obtenidos in vitro e indican que en respuesta a la proteína A el shedding de TNFR1 precede a la aparición de TNF- α .

Luego se determinó el rol del shedding de TNFR1 durante la infección in vivo por *S. aureus*. Para ello se utilizó un modelo murino de infección sistémica en el cual grupos de ratones fueron inoculados por ruta intraperitoneal con *S. aureus* cepa salvaje o una mutante isogénica que no expresa proteína A (*spa*⁻). A fin de evaluar la activación de la cascada de TNF en respuesta a la infección por *S. aureus*, se determinó la expresión de TNF- α en células peritoneales por RT-PCR de tiempo real. Se observó un aumento en los niveles de TNF- α en peritoneo a las 2 luego de la inoculación con *S. aureus*, siendo la respuesta en ratones inoculados con la mutante *spa*⁻ levemente menor a la observada en animales inoculados con la cepa salvaje (Figura 4A). El aumento en la producción de TNF- α se correlacionó con un aumento en la expresión de ARN mensajero para dicha citoquina (Figura 4B). No se observó, sin embargo, un aumento significativo en los niveles de receptor soluble en peritoneo (Figura 4C). Luego se evaluó la presencia de receptor soluble y TNF- α en suero a diferentes tiempos luego de la inoculación. Se observó un aumento significativo en los niveles de TNFR1 soluble a las 2 horas luego de la inoculación con *S. aureus* (Figura 5B) con respecto a lo observado en animales control (inoculados con PBS). El shedding de TNFR1 no se observó en ratones inoculados con una mutante isogénica que no expresa proteína A (*spa*⁻, Figura 5D-F). A fin de determinar el rol del shedding de TNFR1 in vivo se determinó la biodisponibilidad de su ligando TNF- α en suero de ratones infectados con *S. aureus* y con la mutante *spa*⁻. Se observó un aumento significativo de los niveles de TNF- α circulantes en ratones inoculados con la cepa *spa*⁻ a las 4 horas luego del desafío (Figura 5L). Por el contrario no pudo detectarse TNF- α en suero de ratones inoculados con *S. aureus*, siendo los niveles circulantes a las 4 horas post-inoculación inferiores al nivel basal (Figura 5I). Estos resultados sugieren que la presencia de niveles elevados

de TNFR1 soluble en suero podría neutralizar el TNF- α inducido durante la infección por *S. aureus*.

DISCUSION

TNF- α es una citoquina crítica para la erradicación de microorganismos. Su acción vía TNFR1 induce la producción de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias tales como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , GM-CSF e IFN de tipo I que contribuyen al reclutamiento, activación y regulación de la sobrevivencia de neutrófilos y macrófagos en el sitio de infección (Maini et al., 1995). La exacerbada producción de TNF- α que se observa en determinados procesos infecciosos o inflamatorios causa sin embargo daño a los tejidos y puede conducir a falla multiorgánica y muerte, una situación frecuente en pacientes sépticos. Es por ello que a lo largo de varios ensayos clínicos se ha evaluado la neutralización de TNF- α como una estrategia para prevenir los efectos no deseados de dicha citoquina. Los resultados obtenidos no demostraron sin embargo un beneficio significativo en la evolución de pacientes sépticos indicando que otros mediadores inflamatorios están involucrados en el proceso y confirmando que la presencia de moderados niveles de TNF- α sería necesaria para la eliminación de los microorganismos (Lorente and Marshall, 2005). Más aún, el tratamiento de enfermedades inflamatorias no infecciosas tales como lupus o artritis reumatoidea con anticuerpos neutralizantes contra TNF- α ha demostrado un elevado riesgo de enfermedades infecciosas (Chen et al., 2006; Woolacott et al., 2006) y en particular infecciones por *S. aureus* (Marques et al., 2010). Los ensayos clínicos en conjunto indican que la neutralización de TNF- α no sería beneficiosa para la resolución de las infecciones estafilocócicas invasivas y podría por el contrario predisponer al desarrollo de las mismas.

Las respuestas inducidas por TNF- α se encuentran fisiológicamente reguladas mediante la disponibilidad del receptor TNFR1 en la membrana celular. El clivaje del dominio extracelular de TNFR1 por la enzima ADAM17 y otras proteasas permite terminar la señalización por dicho receptor y provee además receptor soluble que neutraliza el TNF- α circulante. La activación de ADAM17 y el shedding de TNFR1 en células inmunes han sido descritos en respuesta a diferentes estímulos relacionados con procesos infecciosos y sépticos (Robertshaw et al., 2005). El mismo ocurre a tiempos que varían entre las 6 y 10 horas post estimulación (Bell et al., 2007) y sería un proceso crítico en la terminación de la señalización de TNF- α . La importancia de la

regulación negativa de la señalización de TNF- α queda perfectamente ejemplificada en pacientes con TRAPS (TNF-R-associated periodic syndrome), una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por episodios de fiebre, inflamación a nivel de piel y articulaciones, dolor abdominal y trastornos musculares. La base genética del TRAPS se debe a una mutación en el dominio extracelular de TNFR1 que no permite el clivaje del mismo con lo cual las concentraciones de receptor soluble en suero son la mitad de las encontradas en individuos sanos (McDermott et al., 1999) generando un estado inflamatorio permanente al perderse la regulación negativa por TNFR1.

A pesar del rol modulador de TNFR1 y otros receptores solubles, su excesiva liberación puede conducir a un desbalance en la respuesta inmune del hospedero. En este sentido, la presencia de elevados niveles de TNFR1 soluble, junto con otros receptores como TNFR2 e IL-1Ra, en suero es un marcador de mal pronóstico en pacientes sépticos ya que contribuye a crear un perfil anti-inflamatorio, bloquea la acción de mediadores inflamatorios como TNF- α e IL-1 β e impide la erradicación de microorganismos (de Pablo et al., 2011).

Una de las mayores estrategias que *S. aureus* utiliza para causar infección en el hombre es su gran capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero mediante una batería de factores de patogenicidad que interfieren con el sistema inmune (Foster 2005). En el presente trabajo nosotros hemos demostrado que la proteína A de *S. aureus* induce el shedding temprano de TNFR1, el cual precede a la aparición de TNF- α en los ensayos in vitro e in vivo. Los resultados obtenidos con una mutante de *S. aureus* que no expresa proteína A sugieren que los elevados niveles de TNFR1 soluble que se observan en respuesta al estímulo con *S. aureus* podrían neutralizar el TNF circulante impidiendo la acción biológica del mismo. El shedding temprano de TNFR1 inducido por la proteína A podría constituir un mecanismo más de evasión de la respuesta inmune durante las infecciones por *S. aureus*.

ABSTRACT

S. aureus is a major nosocomial and community acquired pathogen that frequently causes pneumonia and sepsis. Among its many virulence factors, protein A is expressed on the surface of all isolates and has the ability to interact with the receptor for Tumor Necrosis Factor (TNFR1) and activate TNF- α signaling. TNFR1 signaling is central to the immune response and it is required for bacterial clearance. As excessive TNF- α signaling can be harmful to the host, this cascade is normally down-regulated by receptor avail-

ability. Cleavage of TNFR1 ectodomain by ADAM17 terminates intracellular signaling and provides soluble receptor that serves to neutralize TNF- α .

S. aureus causes infection in humans by using multiple virulence factors but more importantly by its tremendous ability to evade the immune response. In this study, we have demonstrated that *S. aureus* protein A induces early shedding of TNFR1, which precedes TNF- α induction. The results obtained using a protein A deficient mutant suggest that the high levels of soluble TNFR1 induced by *S. aureus* may neutralize TNF- α thus impairing its biological function. In conclusion, induction of early TNFR1 shedding may constitute a novel mechanism used by *S. aureus* to evade the immune response.

BIBLIOGRAFIA

- 1.
1. Abraham et al., 1998. *Lancet* 351:929-933.
2. Bell et al., 2007. *J Leukoc Biol* 82 :173-176.
3. Chen et al., 2006. *Health Technol Assess* 10:iii-iv, xi-xiii, 1-229.
4. de Pablo et al., 2011. *J Intensive Care Med* 26:125-32.
5. Foster T.J. 2005. *Nat Rev Microbiol* 3:948.
6. Garton et al., 2006. *J Leukoc Biol* 79 :1105-1116.
7. Gomez et al., 2004. *Nat Med* 10:842-848.
8. Gomez et al., 2006. *J Biol Chem* 281:20190-20196.
9. Gomez et al., 2007. *EMBO J* 26 :701-709.
10. Hartleib et al., 2000. *Blood* 96:2149-2156.
11. Lorente and Marshall, 2005. *Shock* 24 Suppl 1:107-19.
12. Lowy, F.D. 2007. *Nat Med* 13:1418-20.
13. Maini et al., 1995. *Clin Exp Immunol* 101:201-212.
14. Marques et al., 2010. *J Crohns Colitis* 4:110-113.
15. McDermott et al., 1999. *Cell* 97:133-144.
16. Moks et al., 1986. *Eur J Biochem* 156:637-643.
17. Reddy et al., 2000. *J Biol Chem* 275:14608-14614.
18. Robertshaw et al., 2005. *British J Anaesthesia* 94:222-228.
19. Sasso et al., 1989. *J Immunol* 142:2778-2783.
20. Scheller et al., 2011. *Trends in Immunol* 32 :380-387.
21. Sha et al., 2007. *Eur J Pharmacol* 571 :231-239.
22. Silverman et al., 2006. *Nat Rev Immunol* 6:465-475.
23. Xanthoulea et al., 2004. *J Exp Med* 200 :367-376.
24. Woolacott et al., 2006. *Clin Exp Rheumatol* 24:587-593.

FIGURAS

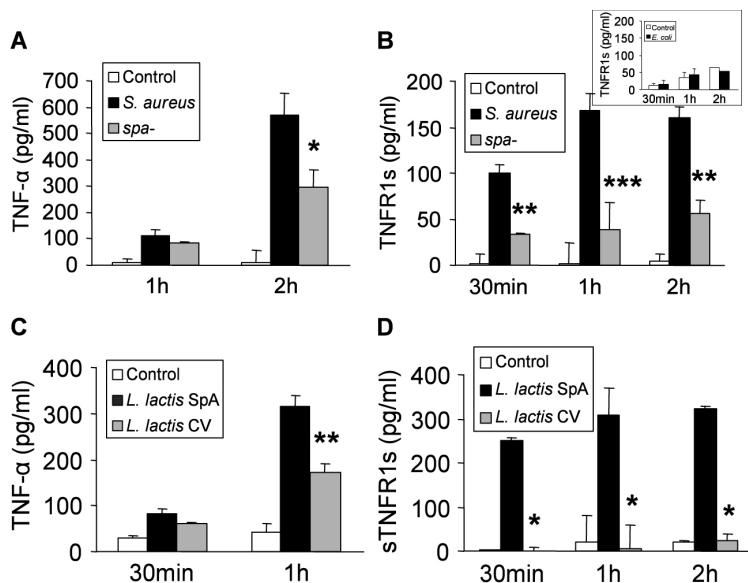


Figura 1. Producción de TNF- α y TNFR1 soluble en respuesta al estímulo con proteína A. Células Raw crecidas a confluencia fueron estimuladas con *S. aureus* o la mutante isogénica que no expresa proteína A (*spa-*) (A, B), con *E. coli* (B, inserto) o con *L. lactis* que expresa proteína A en su superficie (C, D) por los períodos de tiempo indicados y se determinó la producción de TNF- α (A, C) y los niveles de TNFR1 soluble (B, D) por ELISA. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, Test t de Student.

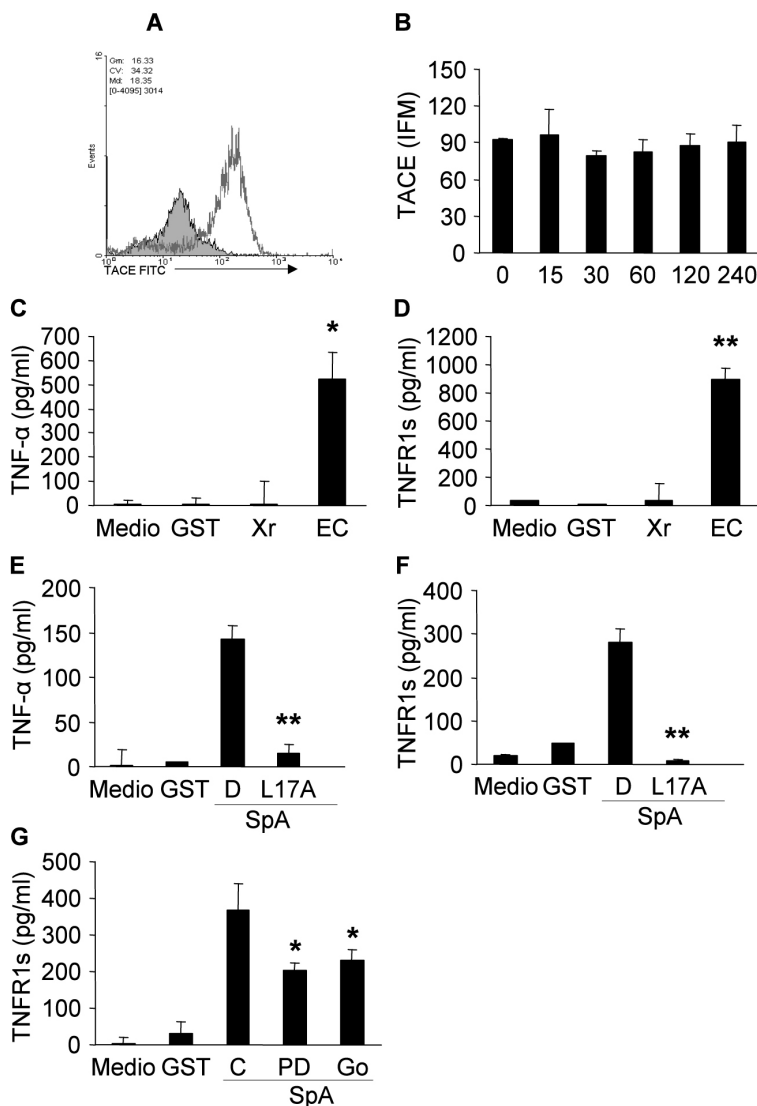


Figura 2. Activación de TACE por la proteína A de *S. aureus*. (A, B) Se determinó la expresión basal de TACE en la superficie de células Raw (A) y la expresión a diferentes tiempos luego de la estimulación con proteína A (B) por citometría de flujo. (C-F) Célu-

las Raw crecidas a confluencia fueron estimuladas con la región amino-terminal de la proteína A (región EC), la región polimórfica Xr, el dominio D, la proteína mutada L17A o GST como control durante 2 horas y se determinó la producción de TNF- α (C, E) y los niveles de TNFR1 soluble (D, F) por ELISA. (G) Células Raw crecidas a confluencia fueron estimuladas con proteína A en ausencia (control) o presencia de inhibidores químicos de la actividad de erk1/2 (PD98058) o PKC (Go6976) y se determinaron los niveles de TNFR1 soluble por ELISA. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, Test t de Student.

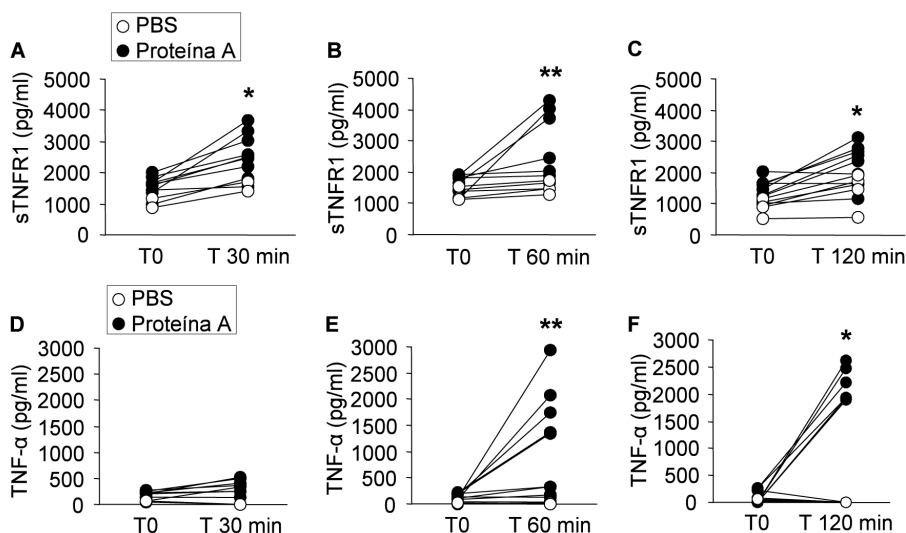


Figura 3. Shedding de TNFR1 in vivo. Grupos de ratones fueron inoculados por ruta intraperitoneal con proteína A recombinante y a diferentes tiempos se determinaron los niveles de TNFR1 soluble y TNF- α en suero por ELISA. Se indican los valores basales y los obtenidos a diferentes tiempos luego de la inoculación para cada ratón. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, Test de Wilcoxon para muestras pareadas.

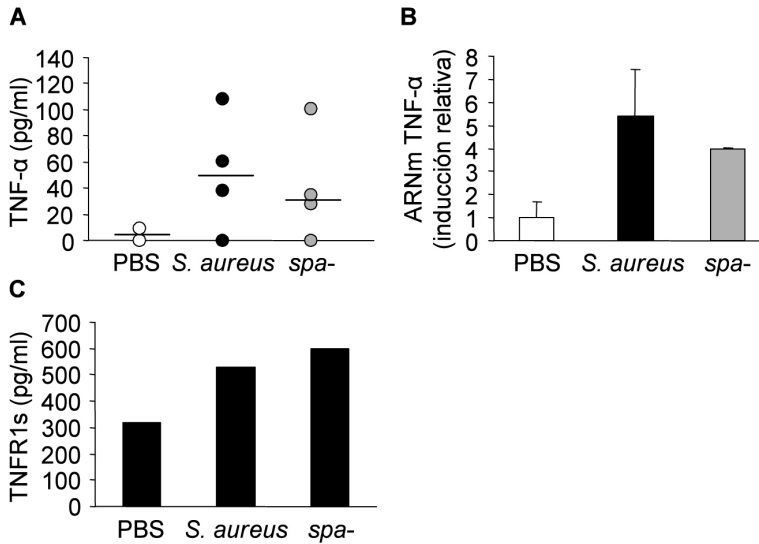


Figura 4. Inducción de la cascada de TNF- α en respuesta a la infección por *S. aureus*. Grupos de ratones fueron inoculados por ruta intraperitoneal con *S. aureus* o la mutante isogénica *spa-* y 2 horas luego de la inoculación se determinó (A) la expresión de ARNm de TNF- α en células peritoneales por RT-PCR de tiempo real y (B, C) los niveles de TNF- α y TNFR1 soluble en peritoneo por ELISA. (A, C) Las barras representan la mediana de los valores obtenidos. (B) Cada punto representa un ratón individual y la barra la mediana en cada grupo.

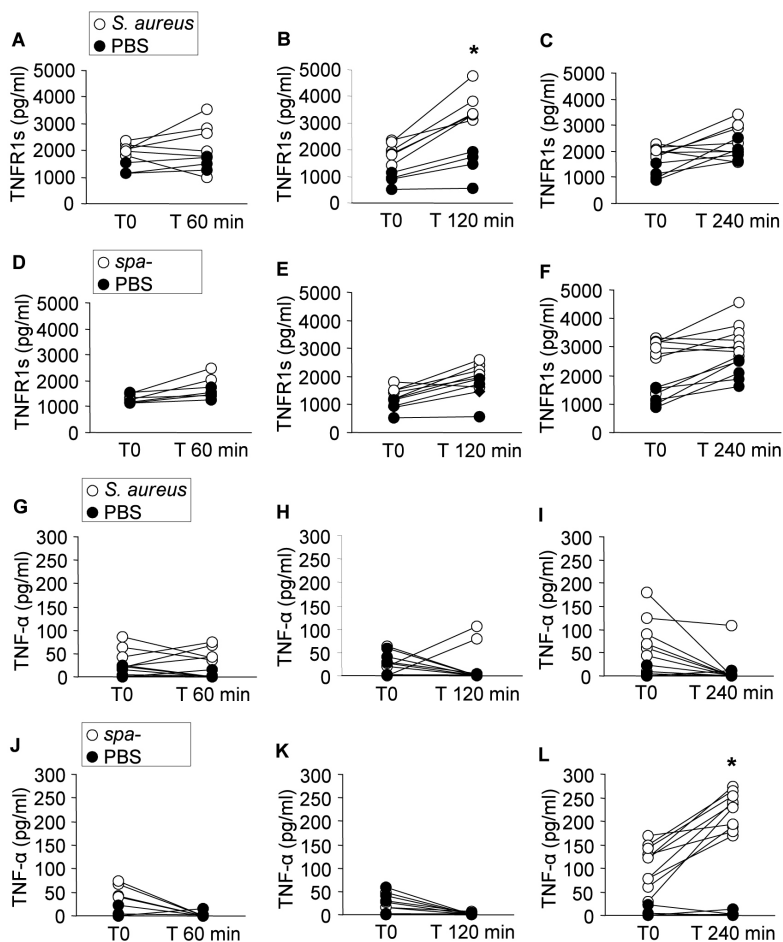


Figura 5. Shedding de TNFR1 durante la infección por *S. aureus*. Grupos de ratones fueron inoculados por ruta intraperitoneal con *S. aureus* o la mutante isogénica *spa*- y a diferentes tiempos se determinaron los niveles de TNF-α y TNFR1 soluble en suero por ELISA. Se indican los valores basales y los obtenidos a diferentes tiempos luego de la inoculación para cada ratón. *: $p < 0.05$, Test de Wilcoxon para muestras pareadas.



MEDICIÓN DE LA RELACIÓN DE EXPRESIÓN DE GENES APOPTÓTICOS *BAX/BCL-XL* EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (LMC)

Mariana Selena Gonzalez, Patricia Gargallo, Irene Larripa.

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

INTRODUCCIÓN

La LMC es un desorden mieloproliferativo crónico caracterizado por la presencia del cromosoma Filadelfia (Ph⁺) (Sawyers et al, 1999) que resulta de una translocación recíproca entre los brazos largos del cromosoma 9 y 22, (Rowley et al, 1973). El resultado de esta translocación es la formación de un gen híbrido *BCR-ABL* fundamental para la patogénesis de la LMC. El desarrollo y el mantenimiento de la mayoría de los tejidos adultos se alcanzan por varios procesos altamente regulados que incluyen proliferación celular, diferenciación y muerte celular programada, en este último las células son eliminadas por un programa suicida llamado apoptosis (Oltvai et al, 1993). Las células pueden morir por apoptosis o por necrosis. Si el daño es violento (patológico) la célula no tiene elección y sufre una forma de muerte no controlada genéticamente (necrosis); pierde la integridad de su membrana y libera su contenido celular. Cuando el daño es sutil, (fisiológico) se generan señales bioquímicas que convergen en la mitocondria, estas organelas especializadas actúan como "sensores de stress" decidiendo la continuidad o no de la célula. En este caso la muerte ocurre por apoptosis (Amarante-Mendes et al, 1999). La apoptosis es un proceso fisiológico en el cual diferentes estímulos activan un programa genético para llevar a cabo una serie específica de eventos y cambios morfológicos y estructurales que resultan en la muerte de la célula (Hockenbery et al, 1995). En cuanto a la regulación de este mecanismo existen genes que suprimen la apoptosis (*BCL-2*, *BCL-XL*, *BCL-W*, *MCL-1*) y otros que la activan (*BAX*, *BAD*, *BAK*, *BCL-XS*). En una célula tumoral la expresión aumentada del gen antiapoptótico *BCL-2*, o su homólogo *BCL-XL* lleva a la célula a disminuir su susceptibilidad a la apoptosis. Otros miembros de esta familia como *BAX*, son inductores de apoptosis y la relación de expresión de miembros anti- y

pro-apoptóticos de la familia *BCL-2* podrían determinar el potencial apoptótico de una célula neoplásica. El crecimiento desregulado de las células neoplásicas a menudo es atribuible a aberraciones genéticas en genes que controlan la proliferación y diferenciación, pero la sobreexpresión de genes que suprimen la muerte celular puede llevar también a un incremento en el número de células sin alterar la velocidad de proliferación celular. La LMC es un ejemplo de tal desorden mieloacumulativo, se caracteriza por un aumento excesivo de células relativamente maduras en la médula ósea y sangre periférica. Los progenitores mieloides presentan índices mitóticos normales, respuesta normal a factor estimulante de colonias y no proliferan más rápido que sus contrapartes normales (Strife and Clarkson, 1988). El transcripto quimérico *BCR-ABL* confiere a la célula oncogénica la capacidad de suprimir la apoptosis activando genes involucrados en señales de supervivencia (Ahmed et al, 1998). El gen *BCR-ABL* podría ser un regulador negativo de la apoptosis y contribuir al desarrollo de la LMC, induciendo la expresión del *BCL-XL* por activación del *STAT5* (*signal transducer activator of transcription*). La cuantificación de genes expresados diferencialmente, *BAX* y *BCL-XL* y su relación (*BAX/BCL-XL*) podría ser útil para caracterizar las diferentes etapas de la enfermedad y predecir la progresión de la patología hacia una etapa más avanzada.

OBJETIVOS

La leucemia mieloide crónica (LMC) se caracteriza por una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22 [t(9;22)(q34;q11)], la cual genera el cromosoma Philadelphia (Ph⁺). Esta translocación da lugar a la formación de un gen de fusión, *BCR-ABL*, que codifica una proteína quimérica P210 constitutivamente activada, confiriendo a la célula hematopoyética una ventaja proliferativa y una menor sensibilidad a la muerte celular por apoptosis. Teniendo en cuenta que alteraciones en la vía de señalización apoptótica actúan como mecanismo de resistencia, los objetivos del presente proyecto son:

- Determinar del nivel de expresión de los genes *BAX* y *BCL-XL* implicados en la vía mitocondrial del programa apoptótico, y la relación entre ellos *BAX/BCL-XL* en pacientes con LMC en diferentes etapas de la enfermedad. El análisis de expresión de estos genes se realizará mediante PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCT) utilizando oligonucleótidos diseñados para este fin.

- Evaluar la respuesta molecular de los pacientes tratados con inhibidores de tirosina quinasa mediante la cuantificación de transcritos *BCR-ABL/ABL* mediante PCR cuantitativa en tiempo real.
- Correlacionar los datos moleculares obtenidos en las diferentes fases de la enfermedad y la clínica de cada paciente. Interpretar la relación de expresión de genes *BAX/BCL-XL* y su implicancia en la progresión de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes y muestras control.

Se estudiaron un total de 66 pacientes con LMC en diferentes etapas de la enfermedad (tabla 1), como muestras control se estudiaron 10 individuos normales. Todos los casos fueron estudiados previo consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética de la Academia Nacional de Medicina de Bs. As. Del total de pacientes 13 se encontraban al diagnóstico de la enfermedad sin tratamiento previo, 34 en fase crónica (FC), 10 en fase acelerada (FA) y 9 en crisis blástica (CB), todos los casos se encontraban bajo tratamiento con inhibidores de tirosina quinasa (ITK).

Tabla 1. Pacientes estudiados

Pacientes totales	66
Hombres	35
Mujeres	31
Rango de edad (años)	19 -79
Al diagnóstico ¹	13
En FC ²	34
En FA ²	10
En CB ²	9

¹ Sin tratamiento previo

² Tratados con ITKs.

Línea celular.

La línea K562 (ATCC catalog, N°CCL-243) es una línea celular derivada de una efusión pleural de un paciente con LMC en crisis blástica (Lozzio et al, 1975). A nivel molecular estas células expresan el rearreglo *BCR-ABL*. Las células fueron mantenidas en RPMI 1640+SFB 10% a 37°C en atmósfera con un 5% de CO₂.

Extracción de ARN total

Se realizó extracción de ARN a partir de leucocitos totales de sangre periférica utilizando *trizol* (Invitrogen Life Technology) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las células fueron lisadas en 1 ml de *trizol*. Luego se agregó 200 ul de cloroformo; se dejó reposar por 2-3 min y se realizó una primera centrifugación a 12000g por 15 min a 4 °C. Al sobrenadante se le agregó 500 ul de isopropanol y se incubó 10 min a temperatura ambiente (TA). Posteriormente se realizó una centrifugación a 12000g por 10 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el pellet de ARN se lavó con 1 ml de etanol 75%. Se centrifugaron las muestras a 7500g por 5 min a 4°C. El pellet obtenido fue resuspendido en agua libre de RNAsas.

Reacción de retrotranscripción inversa (RT)

A partir de muestras de ARN se realizó la síntesis de ADNc utilizando transcriptasa reversa (Promega, Madison, WI, USA). El ciclado incluye desnaturalización a 60 °C durante 5 minutos a partir de 2 ug de RNA y agregado de la mezcla de reacción (dNTPs, Random Primers, Buffer de reacción). Se incubó 5 minutos en frío y se agrega la enzima para la retrotranscripción. Luego de 1 hora a 37 °C se obtiene el ADNc.

PCR cuantitativa en tiempo real (QPCR)

El análisis de expresión de todos los genes estudiados se realizó mediante la técnica de PCR en tiempo real (QPCR) utilizando el cicladore LigCycler 2.0 de Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Para la cuantificación se utilizó una metodología basada en la presencia de SYBR-Green. Las reacciones fueron realizadas en un volumen final de mezcla de reacción de 20 ul conteniendo 5 ul de ADNc, 1X PCR Mix (LC FastStart DNA Master SYBR Green I, Roche), 3,5 mM MgCl₂ y 0,25 uM de cada primer.

La respuesta molecular de cada paciente fue determinada mediante la cuantificación de transcritos *BCR-ABL/ABL*.

Las condiciones de reacción óptimas para la amplificación de *BCR-ABL* y *ABL* fueron las siguientes: 50 ciclos de 4 segmentos de PCR (95° C 5 s, 60° C 3 s, 72° C 12 s, 80° C 1 s) luego de una desnaturalización inicial (95° C 10 min).

Los primers *BCR-ABL* y *ABL* utilizados en este estudio fueron publicados por Gutierrez et al (2005), y Beillard et al (2003), respectivamente.

Para determinar el nivel de expresión de genes relacionados con el programa apoptótico se designaron oligonucleótidos diseñados para este fin utilizando el programa primer Select (DNA Star Lasergene versión 7,0) y el software oligo versión 4.0.

Las condiciones óptimas para la amplificación de estos genes fueron las siguientes: 50 ciclos de 4 segmentos de PCR (95° C 5 s, 62° C 3 s por 5 ciclos y 57° C 3 s por 45 ciclos, 72° C 15 s, 84° C 1 s) luego de una desnaturalización (95° C 10 min).

Los primers designados para ambos genes se detallan a continuación:

BAX forward: 5'-GGG ACG AAC TGG ACA GTA ACA-3'

BAX reverse: 5'-CCG CCA CAA AGA TGG TCA C-3'

BCL-XL forward 5'-ACT GTG CGT GGA AAG CGT AG-3'

BCL-XL reverse 5'-GGT TCT CCT GGT GGC AAT G-3'.

La eficiencia de cada reacción se determinó mediante la construcción de curvas estándar a partir de diluciones seriadas utilizando el ADNc de la línea celular K562.

Análisis estadístico

Los resultados fueron evaluados para determinar su significación estadística utilizando el software GraphPad version 4.0. El análisis estadístico de pacientes en distintos estadios de la LMC se realizó a partir del test t Student. Para realizar una correlación entre las relaciones de expresión *BAX/BCL-XL* y *BCR-ABL/ABL* se realizó el análisis Spearman no paramétrico. Además se realizó el test ANOVA.

RESULTADOS

Expresión de *BCR-ABL* en la respuesta al tratamiento con ITK.

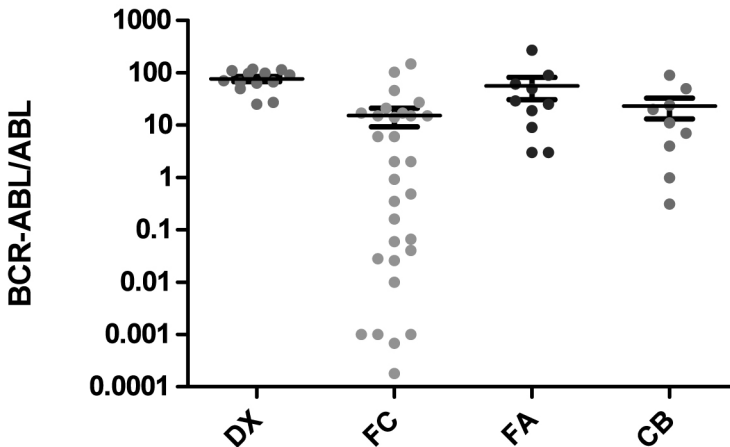
La respuesta molecular fue evaluada en el total de pacientes (66) tratados con ITK mediante cuantificación relativa de transcritos *BCR-ABL/ABL*. Los resultados se resumen en la **Tabla 2, (Fig 1)**.

Tabla 2. BCR-ABL/ABL en las distintas fases de la LMC

Fases de LMC	BCR-ABL/ABL(%) ($\bar{X} \pm \text{SEM}$)
Pacientes al diagnóstico (sin trat) (n=13) **	76.62 $\pm$ 8.6
Pacientes en fase crónica (n=34)	5.89 $\pm$ 1.5
Pacientes en fase acelerada (n=10) **	32.11 $\pm$ 9.8
Pacientes en crisis blástica (n=9) **	23.08 $\pm$ 9.8

Significación estadística respecto del grupo de pacientes en fase crónica $p < 0.01$ **.

Fig 1. Expresión relativa de BCR-ABL/ABL en pacientes con LMC. Los pacientes fueron agrupados de acuerdo a la fase de la enfermedad en que se encontraban al momento del estudio. Al debut (DX), fase crónica (FC), fase acelerada (FA), crisis blástica (CB).



Expresión de genes involucrados en la vía mitocondrial del programa apoptótico (*BAX* y *BCL-XL*).

Se determinó el nivel de expresión de los genes *BAX* y *BCL-XL* y la relación entre ellos, (*BAX/BCL-XL*) en pacientes con LMC en diferentes etapas de la enfermedad y en 10 controles (dadores normales).

Se observó que pacientes al diagnóstico, FA y CB presentaron una relación *BAX/BCL-XL* más baja que la del grupo control ($p < 0.0001$). En el grupo

de pacientes en FC, se observaron valores mayores ($p < 0.01$) respecto de los dadores normales, **tabla 3, (Fig. 2)**.

Tabla 3. Relación de expresión *BAX/BCL-XL*

Fases de LMC	<i>BAX/BCL-XL</i> ($\bar{X} \pm \text{SEM}$)
Controles (dadores normales) (n=10)	4.82 ± 0.59
Pacientes al diagnóstico (n=13) ***	1.28 ± 0.16
Pacientes en fase crónica (n=34) **	8.73 ± 1.21
Subgrupo relación alta (n=28)	10.03 ± 1.30
Subgrupo relación baja (n=6)	2.71 ± 0.40
Pacientes en fase acelerada (n=10) ***	1.14 ± 0.20
Pacientes en crisis blástica (n=9) ***	1.16 ± 0.30

Significación estadística respecto del grupo control $p < 0.01$ **, and $p < 0.001$ ***.

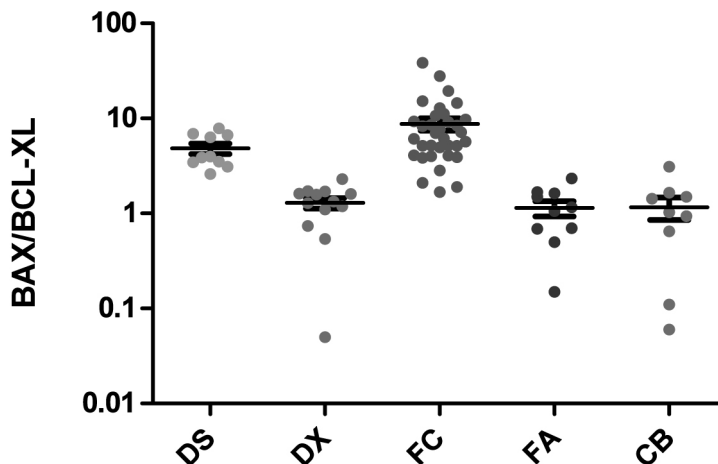


Fig.2. Expresión relativa de genes apoptóticos. Los pacientes con LMC y controles se agruparon de la siguiente manera: dadores sanos (DS), diagnóstico (DX), fase crónica (FC), fase acelerada (FA) y crisis blástica (CB).

Estos datos muestran una disminución significativa en la relación *BAX/BCL-XL* al debut de la enfermedad y a medida que la patología progresa hacia un estado más avanzado, indicando su utilidad como factor pronóstico en LMC.

Análisis de correlación entre *BAX/BCL-XL* y *BCR-ABL/ABL*.

Con la finalidad de estimar la utilidad de la relación *BAX/BCLXL* se realizó un análisis de correlación entre *BCR-ABL/ABL* y *BAX/BCLXL* (Fig. 3). Los datos mostraron claramente una correlación inversa significativa (Spearman $p < 0.0001$), lo cual apoya la implicancia clínica de este estudio. Los casos al diagnóstico, pacientes en FA, CB y 18% de pacientes en FC (seis pacientes dentro del rectángulo, Fig. 3) mostraron una reducción significativa en los niveles de *BAX/BCLXL*. Por otro lado, la mayoría de los pacientes en FC mostraron un aumento en la relación *BAX/BCLXL*.

Estos datos indican que la relación *BAX/BCLXL* pudo identificar un sub-set de pacientes en FC con poca respuesta a los ITKs aunque estos casos arrojen valores bajos de transcritos *BCR-ABL*.

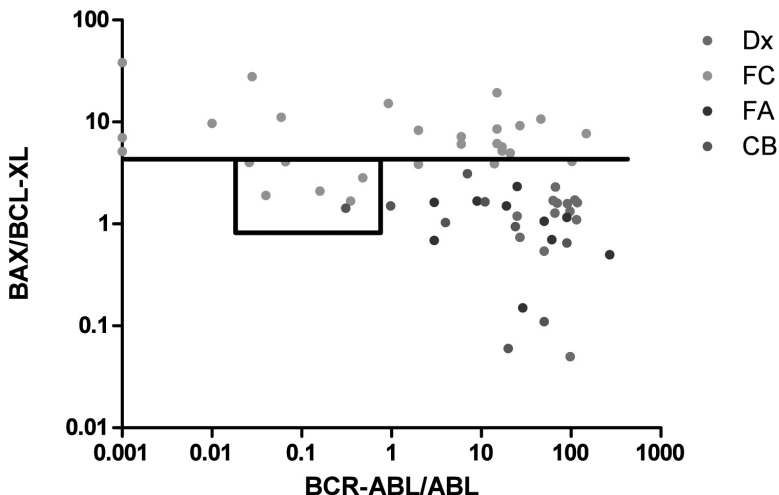


Fig. 3. Correlación entre las relaciones de expresión *BAX/BCL-XL* y *BCR-ABL/ABL*. Se realizó un test Spearman obteniendo una correlación inversa significativa $P < 0.0001$.

DISCUSIÓN

La Leucemia Mieloide crónica (LMC) es una enfermedad hematopoyética clonal caracterizada por la presencia del cromosoma Philadelphia (Ph), t(9;22)(q34;q11.2) (Faderl et al, 1999).

La mayoría de los pacientes con LMC son tratados con ITKs, los cuales inhiben la función del gen de fusión *BCR-ABL*. La mayoría de las células *BCR-ABL* positivas sufren apoptosis cuando su actividad tirosina quinasa es suprimida por los inhibidores. La presencia de *BCR-ABL* está ligada a la up-regulación de genes anti apoptóticos como *BCL-XL* (Brumati et al, 2003).

Teniendo en cuenta que la incapacidad para sufrir apoptosis es un importante mecanismo que lleva a la resistencia a drogas y a la evolución neoplásica, la relación de expresión de los genes *BAX/BCL-XL* podría ser utilizada como un monitor molecular de respuesta terapéutica con gran utilidad como factor pronóstico en LMC. En este trabajo observamos diferencias significativas en la relación *BAX/BCL-XL* entre pacientes con LMC en diferentes estadios, con una marcada disminución al debut de la enfermedad y a medida que la patología progresa hacia un estado más avanzado.

La relación *BAX/BCL-XL* arrojó una correlación inversa significativa (Spearman $p < 0.0001$), con respecto a los transcriptos *BCR-ABL/ABL*, indicando que una relación *BAX/BCL-XL* disminuida estaría asociada a progresión de la enfermedad.

La expansión mieloide observada en LMC podría ser debida a una prolongada supervivencia celular antes que un exceso en la proliferación. La proteína quimérica P210 producto del reordenamiento *BCR-ABL*, activa varios caminos de señalización incluyendo *STAT5*. Estos cambios llevan a la transformación maligna porque interfieren con procesos celulares básicos tales como proliferación, diferenciación y apoptosis. Se ha demostrado que el factor de transcripción, *STAT5* esta constitutivamente activado regulando la sobreexpresión de *BCL-XL* en LMC. Ambas condiciones son necesarias para la resistencia a la apoptosis y supervivencia de las células leucémicas.

La cuantificación de los transcriptos *BCR/ABL* junto a los genes *BAX* y *BCL-XL* permitirá determinar un perfil de expresión característico de cada etapa de la enfermedad. La expresión diferencial de estos genes podría ser útil para predecir: respuesta al tratamiento, agresividad de la LMC y su progresión a etapas más avanzadas.

ABSTRACT

BCR-ABL fusion gene is implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia (CML), encoding the oncoprotein p210^{BCR-ABL} with an anti-apoptotic activity. The inability to undergo apoptosis is an important mechanism of drug resistance and neoplastic evolution in CML. The gene transcript expression of mitochondrial apoptotic related gene *BAX* and *BCL-XL* were evaluated *in vivo* in peripheral blood of 66 CML patients in different stages of the disease: 13 cases at diagnosis, 34 in chronic phase (CP), 10 in accelerated phase (AP) and 9 in blast crisis (BC) by quantitative Real Time PCR (qPCR).

A significantly lower *BAX/BCL-XL* expression ratio (mean $\pm$ SEM) than a group of healthy individuals (4.8 ± 0.59) were observed in CML patients at diagnosis (1.28 ± 0.16), in AP (1.14 ± 0.20), in BC (1.16 ± 0.30) and in 18% of cases of patients in CP (2.71 ± 0.40). Most CP cases (82%) showed a significantly increased ratio (10.03 ± 1.30), indicating that the treatment with TKIs efficiently inhibited the expression of *BCL-XL* by blocking *BCR-ABL* oncoprotein.

The *BAX/BCL-XL* ratio showed a significant inverse correlation (Spearman $P < 0.0001$) with *BCR-ABL/ABL* relative expression indicating that low *BAX/BCL-XL* was associated with disease progression.

Our data suggest that *BAX/BCL-XL* expression ratio may be a sensitive monitor of disease progression and an early predictor of TKI therapy responsiveness in CML patients.

RESUMEN

La LMC es un desorden mieloproliferativo crónico caracterizado por la presencia del cromosoma Filadelfia que resulta de una translocación recíproca entre los brazos largos del cromosoma 9 y 22. El resultado de esta translocación es la formación de un gen de fusión *BCR-ABL* implicado en la patogénesis de la enfermedad. Este gen codifica para la oncoproteína p210^{BCR-ABL} con actividad antiapoptótica aumentada. La incapacidad de sufrir apoptosis es un importante mecanismo de resistencia a drogas y evolución neoplásica en LMC. En este trabajo evaluamos el nivel de expresión de genes implicados en la vía mitocondrial del programa apoptótico, *BAX* y *BCL-XL*, en muestras de sangre periférica de 66 pacientes con LMC en diferentes etapas de la enfermedad: 13 casos al diagnóstico sin tratamiento previo, 34 pacientes en fase crónica (FC), 10 en fase acelerada (FA) y 9 en crisis blástica mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

Se observó la relación *BAX/BCL-XL* en pacientes al diagnóstico (1.28 ± 0.16), FA (1.14 ± 0.20) y CB (2.71 ± 0.40) y un 18 % de los casos en FC (2.71

± 0.40) fue significativamente más baja que la del grupo control (4.8 ± 0.59) ($p < 0.0001$). La mayoría de los casos en FC (82%), presentaron una relación de expresión incrementada (10.03 ± 1.30) ($p < 0.01$) respecto de los dadores normales indicando que el tratamiento con inhibidores de tirosina quinasa (ITKs) inhibe la expresión de *BCL-XL* por bloqueo de la oncoproteína *BCR-ABL*.

La relación *BAX/BCL-XL* arrojó una correlación inversa significativa (Spearman $p < 0.0001$) con *BCR-ABL/ABL*, demostrando que una baja relación de expresión *BAX/BCL-XL* esta asociada con progresión de la enfermedad.

Nuestros datos sugieren que la relación de expresión *BAX/BCL-XL* podría actuar como un monitor de progresión de enfermedad y predictor temprano de respuesta terapéutica a los ITKs en pacientes con LMC.

REFERENCIAS

1. Ahmed M., Dusanter-Fourt I, Bernard M. BCR-ABL and constitutively active erythropoietin receptor (CEpoR) activate distinct mechanism for growth factor independence and inhibition de apoptosis in Ba/F3 cell line. *Oncogene* 1998; 16: 489-496.
2. Amarante-Mendes, Green DR. The regulation of apoptotic cell death 1999; *Braz J Med Biol Res.* 1999 Sep;32(9):1053-61.
3. E. Beillard, N. Pallisgaard, V. van der Velden, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using "real-time" quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ_PCR) – a Europe against cancer program. *Leukemia* 17 (2003) 2318 – 2357.
4. G. Brumatti, R. Weinlich, C. Chehab, et al. Comparison of the anti-apoptotic effects of BCR-ABL, BCL2 and BCL-XL following diverse apoptogenic stimuli. *FEBS Let* 541(2003) 57 – 63.
5. S. Faderl, M. Talpaz, Z. Estrov, et al. The biology of chronic myeloid leucemias. *N. Engl J. Med* 341 (1999) 164-172.
6. M. Gutierrez, G. Timson, A. Siraj, et al. Single monochrome real-time RT-PCR assay for identification, quantification and breakpoint cluster region determination of t(9;22) transcripts. *J. Mol. Diag* 7(2005) 40-47.
7. Hockenbery, D. (1995). Defining apoptosis. *Am. j. Pathol.* 146: 16-19.
8. C. Lozzio, B. Lozzio. Human chronic myelogenous leukemia cell line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45 (1975) 321- 326.
9. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with

a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993 Aug 27;74(4):609-19.

10. Rowley JD, 1973 Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973 Jun 1;243(5405):290-3.
11. Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999; 340:1330-1340
12. Strife A, Clarkson B. Biology of chronic myelogenous leukemia: is discordant maturation the primary defect?. *Semin Hematol.* 1988 Jan; 25(1):1-19.

ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA/SUSCEPTIBILIDAD AL DESAFÍO CON *TRICHINELLA SPIRALIS* EN RATONES DE DISTINTO GENOTIPO. ESTUDIO DEL PERFIL TH1/TH2 EN LA ETAPA AGUDA DE LA INFECCIÓN

Lucila I. Hinrichsen, María Delia Vasconi, Natalia Panero Schipper,
Ana V. Codina, Ricardo J. Di Masso,
Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas,
Universidad Nacional de Rosario

INTRODUCCIÓN

La trichinellosis, infección producida por *Trichinella spiralis* (Ts), es una de las principales enfermedades zoonóticas de América Latina y un problema a nivel mundial. En el hombre es altamente patogénica. Actualmente no existe un tratamiento oportuno que limite esta parasitosis pues no siempre puede diagnosticarse en sus comienzos, por lo que la infección sigue su curso desarrollando la enfermedad. Por lo tanto, la prevención es clave y para ello deberían implementarse, entre otras, medidas tendientes a disminuir la cantidad de mamíferos capaces de infectarse con este nematodo. Estas medidas requieren la comprensión de los mecanismos íntimos que regulan la relación hospedero-parásito. Entre los múltiples factores que intervienen en esta interrelación, el genotipo del huésped juega un rol muy significativo en el establecimiento de estas infecciones. La respuesta para resistir las enfermedades parasitarias está bajo control genético y varía entre especies y entre individuos dentro de especie. En este contexto, los ratones han jugado un rol importante en esclarecer las vías moleculares que contribuyen a la enfermedad y son valiosos para disecar los efectos de los genes del huésped en caracteres complejos (9) como las enfermedades infecciosas, usando, entre otros enfoques, líneas endocriadas bien definidas. El Instituto de Genética Experimental de la Facultad de Ciencias Médicas, UNR, cuenta con un modelo experimental (colonia CBI-IGE) constituido por cuatro líneas de ratones (CBI+, CBI-, CBI/L y CBI/C) producidas por selección artificial divergente y una quinta línea CBI, que se mantiene como testigo sin selección (1). Después de más de 120 generaciones de cría selectiva cada una de ellas constituye un genotipo particular (4). Estas líneas han demostrado diferencias en su comportamiento ante infecciones naturales o experimentales con diferentes tipos de parásitos (10).

El resultado de la infección por parásitos depende en gran medida de la capacidad del huésped para desarrollar anticuerpos y una respuesta inmune celular, desarrollar una actividad NK y producir citoquinas, es decir para montar una respuesta inmune normal, lo que está claramente bajo control génico. Parte de nuestra comprensión de los procesos implicados en la expulsión inmune de *Ts* se deriva de estudios en ratones, en los que la expulsión de las larvas adultas depende de la dosis de larvas infectantes y del genotipo del hospedero (3; 11). Estos mecanismos de expulsión constituyen un complicado proceso mediado por el sistema inmune, que involucra la activación de células Th2 y de mastocitos (6; 8). La eosinofilia, respuesta característica de la infección por helmintos tisulares juega también un rol importante tanto en el desarrollo y expresión de una efectiva resistencia antiparasitaria como en la inducción de patología (2). Sus valores pueden ser utilizados como marcadores de la capacidad del hospedero para montar una respuesta inflamatoria, la que se encuentra bajo control génico.

El objetivo de este trabajo fue identificar variables que estiman la resistencia del hospedero y analizar la evolución de la eosinofilia y del perfil sérico Th1/Th2, en la primoinfección por *Trichinella spiralis*, en ratones de líneas susceptibles y resistentes del modelo murino CBI-IGE, para evaluar una posible asociación entre el grado de infección alcanzado en el hospedero y la calidad de su respuesta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales. Se utilizaron ratones adultos de ambos sexos (n=30 por genotipo y por sexo), de las líneas CBI+ y CBI-, obtenidas por selección agonística; CBI/C y CBI/L, derivadas de una selección antagónica, y CBI, no seleccionada. Los ratones se pretrataron con fenbendazol para eliminar los enteroparásitos naturales. El manejo de los ratones se hizo de acuerdo a normas establecidas por el Institute for Laboratory Animal Resources, National Research Council, USA.

Desafío con una única dosis oral de larvas de *T. spiralis*. Los ratones se infectaron por vía oral con 2 larvas infectantes L1 por g de peso corporal (dosis equivalente), ya que las líneas muestran diferencias significativas de peso corporal (11). La larvas se obtuvieron por digestión artificial con pepsina - HCl de músculo de ratones CBI infectados para tal fin. El comportamiento de las líneas frente a este parásito se evaluó analizando distintas variables en el período agudo (entérico) y el crónico (parenteral) de la infección.

Análisis de la respuesta en el período agudo. Después del desafío con una dosis del parásito, un tercio de los ratones infectados se sacrificó en el día 6 post-infección (p-i) y otro tercio en el día 13. El número de parásitos adultos se determinó por conteo del total de parásitos en el contenido intestinal (**nPA**) obtenido por lavado con solución fisiológica del primer tercio del intestino delgado (aproximadamente 20 cm de largo) (7). La fecundidad de las hembras *Ts* se midió contando el número de larvas nacidas de cada hembra aislada (7). Los datos se expresaron como número promedio de larvas nacidas por parásito hembra (**Fh**).

Análisis de la respuesta en el período crónico. A los 32 ± 2 días p-i se determinó la carga parasitaria muscular (CP) por recuento del número de larvas en lengua, que se pesó a la décima de mg. El número de larvas se expresó como número total de larvas por mg de tejido fresco (**CPr**) y se estimó el índice de capacidad reproductiva de *Ts* (**ICRr**) aplicando la siguiente fórmula: $ICRr = CPr / \text{dosis infectiva}$; debido a su independencia de la dosis infectiva, ICRr resulta útil para comparar efectos de genotipos dentro de sexo y de sexo dentro de genotipo.

Análisis de la eosinofilia. El porcentaje de eosinófilos se determinó en extendidos de sangre periférica coloreados con May Grunwald-Giemsa, obtenidos en los días 6, 13 y 30 pos-infección. Esta medición se realizó también en cada ratón antes del desafío con *Ts* (eosinofilia basal) y su mediana se utilizó como valor normal de referencia.

Análisis del perfil Th1/Th2 en la producción de citoquinas. Los niveles séricos de las citoquinas interferón- γ e IL-2 (Th1) y las citoquinas IL-4 e IL-10 (Th2) se analizaron en ratones infectados con *Ts* los días 6, 13 y 30 p-i. En las fechas especificadas, se obtuvo sangre por punción cardíaca y se separó el suero. Los niveles séricos de las citoquinas se midieron con la técnica de ELISA, utilizando un kit comercial (Becton Dickinson OptEIA™). Cada determinación se realizó por duplicado.

Análisis estadístico. El significado estadístico de la diferencia entre sexos, dentro de línea, se estimó con la prueba “t” de Student o con la “U” de Mann-Whitney. Las diferencias entre líneas, dentro de sexo, se analizaron con un ANOVA a un criterio (y el test de Bonferroni como prueba de comparaciones múltiples) o con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (utilizando el pos-test de Dunn), según correspondiera. Las diferencias se consideraron significativas si $P < 0.05$.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En la etapa parenteral de la infección con *Ts* se observó una influencia significativa del hospedero sobre la carga parasitaria muscular, **CPr**, tanto en machos como en hembras ($P<0.0001$) (tabla 1). El genotipo CBi+ fue el más susceptible mientras que CBi/L resultó el más resistente; aunque los genotipos restantes mostraron valores intermedios, sólo los machos CBi- y las hembras CBi/C difirieron de ambos genotipos extremos.

Líneas Variables	CBi+	CBi-	CBi	CBi/C	CBi/L
Machos					
CPr* 30 días	842±159.3 ^a	386±81.7 ^b	747±136.0 ^a	763±70.8 ^a	129±15.2 ^c
ICRr* 30 días	8.2±1.57 ^a	6.9±1.53 ^a	9.8±1.69 ^a	7.5±0.68 ^a	2.1±0.24 ^b
Hembras					
CPr 30 días	1094±147.1 ^a	757±342.8 ^{a, b, d}	605±87.2 ^b	469±86.3 ^b	176±25.1 ^d
ICRr 30 días	11.3±1.44 ^a	14.5±6.28 ^a	10.0±1.52 ^a	5.1±0.86 ^b	3.2±0.47 ^b

* media±EE

Para cada fila, grupos con superíndice distinto son significativamente diferentes ($P<0.05$).

ICRr permitió clasificar a los huéspedes como susceptibles o resistentes a *Ts*, independientemente de la dosis infectiva (tabla 1). La variable también permitió observar un efecto de sexo sobre la interacción hospedero-parásito, ya que las hembras CBi/L y CBi/C fueron resistentes, mientras que en los machos sólo CBi/L fue el genotipo resistente y CBi/C no se diferenció de los genotipos susceptibles. Este resultado no solo concuerda con la hipótesis de que las hembras son más resistentes que los machos a las infecciones parasitarias sino que agrega que el dimorfismo sexual en la respuesta depende de la constitución genética del hospedero.

Aunque en general no se encontraron diferencias significativas atribuidas al sexo del hospedero, las hembras CBi/C fueron más resistentes que los machos tanto cuando se evaluó **CPr** ($P=0.024$) como **ICRr** ($P=0.046$); por el contrario, las hembras CBi/L mostraron un **ICRr** mayor que los machos ($P=0.038$).

El comportamiento de las líneas en la etapa intestinal de la primoinfección se resume en la tabla 2. No se observaron efectos significativos de sexo o genotipo en el día 6 p-i en las variables estudiadas ($P < 0.05$). En CBi/L se observó una disminución de **nPA**, de la proporción de ratones con Ts y de Fh entre los 6 y 13 días p-i ($P < 0.001$). En CBi+ y CBi/C, hubo una disminución de nPA en ese lapso ($P < 0.01$) sin que se modificaran Fh y la proporción de ratones con Ts ($P > 0.05$), mientras que CBi- y CBi no mostraron modificaciones en esas variables ($P > 0.05$). Las diferencias observadas en la carga parasitaria muscular (CPr) en las cinco líneas se explicaría en parte por la respuesta de cada genotipo en la fase intestinal de la infección.

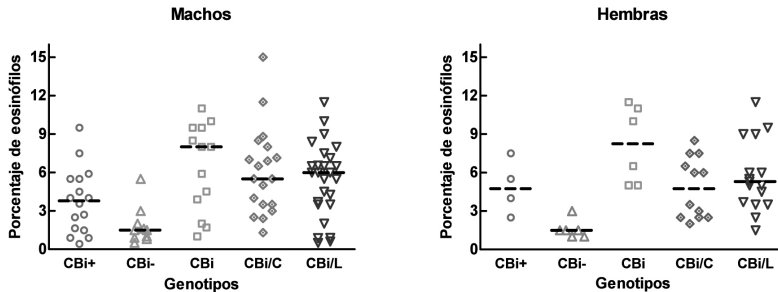
Líneas Variables	CBi+	CBi-	CBi	CBi/C	CBi/L
Machos					
nPA 6 días	11 ^a (0-26)	13 ^a (5-18)	12.5 ^a (3-24)	13 ^a (2-25)	13 ^a (0-24)
nPA 13 días	5 ^{a, b} (0-16)	10 ^{a, b} (0-17)	9 ^a (2-20)	3.5 ^b (0-13)	0 ^c (0-4)
Fh* 6 días	36.3±4.02 ^a	53.7±7.21 ^a	46.6±5.35 ^a	42.4±3.34 ^a	41.1±3.00 ^a
Fh* 13 días	46.9±6.34 ^a	75.1±16.11 ^{a, b}	55.7±6.64 ^a	53.6±9.56 ^a	23.5±3.57 ^b
Hembras					
nPA 6 días	10.5 ^a (1-37)	6 ^a (2-18)	11 ^a (0-24)	13 ^a (3-34)	12 ^a (4-23)
nPA 13 días	1 ^a (0-4)	2 ^b (0-10)	5 ^b (0-13)	6 ^b (1-17)	0 ^a (0-1)
Fh 6 días	43.4±7.52 ^a	65.0±10.18 ^a	41.6±4.61 ^a	51.1±6.48 ^a	40.4±2.34 ^a
Fh 13 días	57.7±5.89 ^a	106.0±19.54 ^a	35.4±5.28 ^b	57.6±8.86 ^b	----#

§mediana(rango) *media±E.E.

#No se encontraron hembras Ts o no eran viables.

Para cada fila, grupos con superíndice distinto son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Figura 1. Valores basales de eosinófilos periféricos en machos y hembras de las líneas CBI-IGE

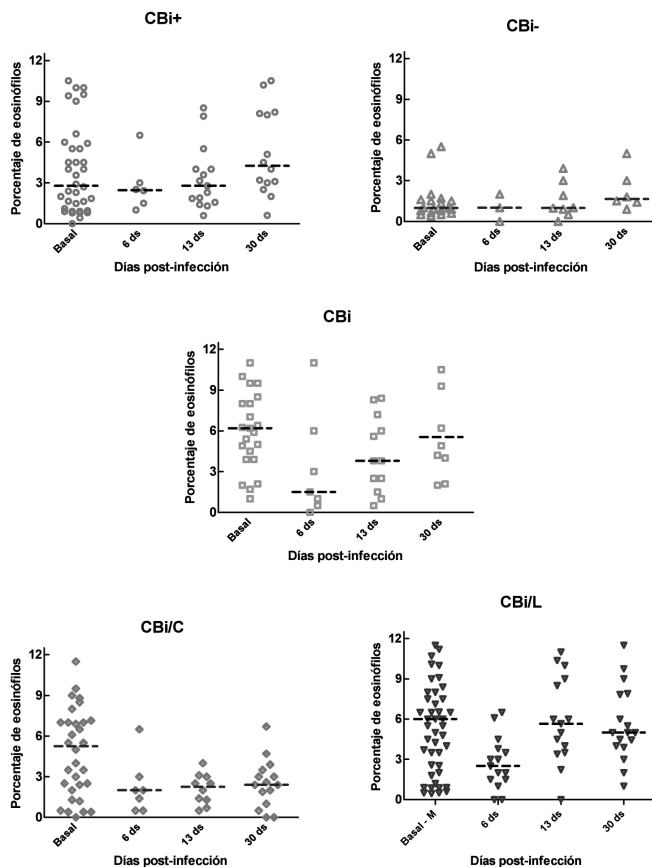


La figura 1 muestra los valores basales de eosinófilos (**Eo**) en machos y hembras CBI-IGE. No se observaron diferencias significativas entre sexos, dentro de genotipos ($P < 0.05$). CBI- tuvo **Eo** basal significativamente menor que los otros genotipos ($P < 0.0001$).

A los 6 días p-i (figura 2) todos los genotipos mostraron un valor de **Eo** menor que el basal ($P < 0.05$). Los ratones CBI/L, resistentes a *Ts*, disminuyeron **Eo** en el día 6 p-i coincidiendo con un número alto de adultos a nivel intestinal mientras que, en el día 13 p-i el número de parásitos intestinales disminuyó y **Eo** retornó a valores basales. Este comportamiento contribuiría tanto a la eliminación de parásitos adultos a nivel intestinal como a nivel pulmonar. Los ratones CBI- y CBI/C mostraron una eliminación retardada de parásitos adultos a nivel intestinal y una alta CP muscular coincidentes con valores de **Eo** que disminuyeron y permanecieron bajos durante el lapso estudiado. Los genotipos CBI+ y CBI recién alcanzaron valores cercanos a los basales a los 30 días p-i.

La variabilidad en la respuesta de **Eo** observada en los distintos genotipos y su asociación con CP sugieren que el eosinófilo es capaz de actuar en distintos momentos del ciclo evolutivo del parásito en la primoinfección. A nivel intestinal activaría mecanismos promotores de la inflamación que ayudan a la reducción del número de larvas infectantes; en el pulmón colaboraría en la eliminación de larvas recién nacidas a través de mecanismos inmunes específicos dependientes o no de anticuerpos.

Figura 2. Efecto del genotipo del hospedero sobre la evolución de eosinófilos periféricos pos-infección con *Ts*



La evolución de las interleuquinas séricas se estudió en machos y hembras de los genotipos Cbi+, Cbi y Cbi/L en los días 6, 13 y 30 p.i. Debido a que no hubo diferencias entre sexos y a la gran variabilidad de los datos se analizaron machos y hembras juntos (tabla 3).

Los resultados señalan que la primoinfección por *Ts* genera una respuesta combinada de citoquinas, que fue diferente en cada genotipo, y que

el desarrollo de la infección dependerá de su acción conjunta. IL-2 aumentó tempranamente en las tres líneas, aunque en distinta proporción en cada una. Los valores de INF γ fueron siempre mayores en las líneas susceptibles. En CBi/L IL-4 e IL-10 mostraron valores más altos al comienzo de la infección. Estos resultados sugieren que la “susceptibilidad” podría deberse a una respuesta inmune tardía que facilitaría al parásito completar su ciclo biológico y que se acompaña, además, con la inducción de una respuesta Th1 no protectora. La “resistencia” de CBi/L sería el resultado de una respuesta inmune temprana y una orientación preferencial hacia una respuesta de tipo Th2 que retardaría la maduración de las larvas infectantes y crearía un ambiente inapropiado para el establecimiento de los adultos.

Tabla 3. Efecto del genotipo del hospedero sobre la evolución de las interleuquinas séricas[§] durante la primoinfección con *Ts*

Líneas Variables	CBi+	CBi	CBi/L
IL-2 (pg/ml)			
6 días p-i	3.8 $\pm$ 0.97 ^a	0.9 $\pm$ 0.23 ^a	1.7 $\pm$ 0.18 ^{a,c}
13 días p-i	4.8 $\pm$ 1.12 ^a	2.3 $\pm$ 0.13 ^b	4.8 $\pm$ 2.75 ^a
30 días p-i	1.0 $\pm$ 0.05 ^b	1.6 $\pm$ 0.13 ^c	1.1 $\pm$ 0.25 ^c
IL-4 (pg/ml)			
6 días p-i	47.5 $\pm$ 6.38 ^a	4.7 $\pm$ 0.84 ^a	9.0 $\pm$ 1.66 ^a
13 días p-i	53.5 $\pm$ 6.11 ^a	11.2 $\pm$ 2.19 ^{b,c}	5.8 $\pm$ 1.66 ^a
30 días p-i	54.9 $\pm$ 4.06 ^a	7.1 $\pm$ 0.55 ^{a,c}	6.6 $\pm$ 1.58 ^a
IL-10 (pg/ml)			
6 días p-i	44.9 $\pm$ 3.25 ^a	24.2 $\pm$ 6.83 ^a	36.6 $\pm$ 2.55 ^a
13 días p-i	47.3 $\pm$ 3.07 ^a	27.3 $\pm$ 3.41 ^a	25.4 $\pm$ 4.14 ^a
30 días p-i	10.5 $\pm$ 0.50 ^b	22.0 $\pm$ 2.84 ^a	22.1 $\pm$ 4.56 ^a
INF-g (pg/ml)			
6 días p-i	170.7 $\pm$ 32.77 ^a	21.5 $\pm$ 6.81 ^a	15.4 $\pm$ 6.83 ^a
13 días p-i	193.1 $\pm$ 34.13 ^a	22.4 $\pm$ 7.13 ^a	17.4 $\pm$ 6.06 ^a
30 días p-i	161.1 $\pm$ 15.16 ^a	70.5 $\pm$ 10.43 ^b	9.7 $\pm$ 1.86 ^a

[§]media $\pm$ EE

Para cada columna, grupos con superíndice distinto difieren, al menos, al 0,05

El parasitismo, fenómeno general de adaptación y dependencia entre dos organismos es, lejos, la más compleja de las relaciones entre seres

vivos. La característica esencial de la infección parasitaria es su cronicidad (1) tendiendo a un equilibrio complejo y durable entre parásito y hospedero en el cual la agresión parasitaria es limitada por la respuesta inmune sin lograr, en la mayoría de los casos, la eliminación del agente extraño. Los complicados ciclos vitales sumados a sus variados nichos ecológicos y formas morfológicas provocan una respuesta inmune compleja por lo que la resistencia a parásitos es un carácter fisiológica y genéticamente complejo, difícil de medir, que está mediada por mecanismos que resultan de la acción combinada de numerosos genes, que no se conocen totalmente. La variabilidad en la respuesta observada en este modelo sugiere su utilidad potencial para dilucidar los mecanismos que regulan la relación compleja y dinámica entre parásito y hospedero.

ABSTRACT

Genetically defined animal models are useful to investigate both resistance to parasitic infections and development of the disease. The immunological basis associated to expulsion of gastrointestinal nematodes as *Trichinella spiralis* (Ts) is not completely understood though it is accepted that a Th2 type of response plays an important role in it. The serum cytokine profile, as well as Ts female fecundity (Fh) and intestinal (nPA) and muscle parasite load (CPr) indicators of resistance to parasite infection, were analyzed in resistant and susceptible mouse lines of the CBI-IGE murine model infected with Ts, to evaluate a possible association between the degree of infection of the host and the quality of its response. Young adult animals from lines CBI+, CBI-, CBI/L, CBI/C and CBI were infected with 2 L1 larvae per g of body weight and sacrificed on days 6, 13 and 30 post-infection (p-i). nPA and Fh were measured on days 6 and 13; CPr was determined on day 30 p-i. Blood eosinophils (Eo) and serum interleukins IL-2, INF- γ , IL-4 and IL-10 were analyzed on days 6, 13 and 30 p-i. CBI/L mice, the resistant genotype, showed a low CPr and a significant decrease of nPA and Fh between days 6 and 13; this behavior was associated with an early Th2 type of response as well as a rapid recovery of normal Eo levels. Contrariwise, CBI+ mice, a susceptible genotype, showed the highest CPr, a decrease in nPA but no change in Fh, between days 6 and 13. These mice exhibited a mixed but predominantly Th1 type of response and no recovery of normal Eo levels until day 30 p-i. The observed variability of the host response in this model suggests that it might be useful to elucidate the mechanisms that control the complex and dynamic relationship between parasite and host.

REFERENCIAS

1. Atías A, Parasitología Médica (3a edición), Publicaciones Técnicas Mediterráneo Ltda., Santiago (Chile), pp 66-101.
2. Bruschi F et al (2008) *Trends Parasitol* **24**:462.
3. Delawi MS and Wakelin D (2002) *J Helminthol* **76**:113.
4. Di Masso RJ et al (1991) *Mendeliana* **9**:79.
5. Hinrichsen LI et al (2010) *J Basic & Applied Genetics* **21**: 1.
6. Ishikawa N et al (1998) *Immunol* **93**:257.
7. Luebke R (2007) *Methods* **41**:38.
8. Patel N et al (2009) *Int J Parasitol* **39**:13.
9. Peters L et al (2007) *Nat Rev Genet* **8**:58.
10. Vasconi MD et al (2008) *Vet Par* **153**:157.
11. Vasconi M D et al (2009) *Lilloa* **45**:110.

BASES FISIOLÓGICAS Y MOLECULARES PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES OVÁRICOS

Dra. Griselda Irusta, Dra. Fernanda Parborell y Dra. Dalhia Abramovich.
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)

SÍNTESIS

El cáncer de ovario es uno de los tumores sólidos que presenta mayor respuesta a los tratamientos, tanto quirúrgico como quimioterápico, aunque generalmente esta respuesta es temporal. Por lo tanto, es recurrente en la mayoría de los casos, y entre las enfermedades ginecológicas es la que posee una mayor relación mortalidad/incidencia. Debido a la ausencia de síntomas específicos en los estadios tempranos de esta enfermedad, no existe una estrategia para su detección y al momento de ser diagnosticado, un 75% de los casos ya presenta metástasis. El cáncer de ovario representa tumores que se originan de células de epitelio del ovario, de células germinales o de células estromales los cuales incluyen tumores de granulosa (TCG). Cabe destacar que en los últimos años no se han realizado avances significativos en la supervivencia de los pacientes que presentan estos tipos de tumores. De aquí que surge la necesidad constante de encontrar nuevos blancos terapéuticos para el desarrollo de nuevas terapias como también, factores que posean valor diagnóstico y pronóstico para esta enfermedad.

Dado que el sistema Notch comprende ligandos y receptores de membrana a los que les ha sido atribuidos características tanto oncogénicas como de supresión tumoral, en el presente trabajo postulamos que este sistema de señalización se encuentra involucrado en la supervivencia y muerte celular (apoptosis) de células ováricas de la granulosa tumorales. Además, sostenemos que Notch participa de la capacidad migratoria de las células mencionadas, y que existe una interacción entre el sistema Notch y otras vías de transducción de señales intracelulares.

Para contrastar nuestra hipótesis estudiamos la expresión de algunos miembros de la vía de Notch en una línea celular ovárica tumoral establecida a partir de un carcinoma humano de granulosa (KGN) y en células de la granulosa humanas normales (CGHs). Además, nos propusimos estudiar la

función del sistema Notch en la proliferación, esteroidogénesis, apoptosis y capacidad de migración de la línea celular KGN, y algunas vías involucradas en dichos mecanismos.

Al estudiar los receptores NOTCH 1 y NOTCH 4, y el ligando JAGGED 1 en la línea KGN y en CGHs, observamos una expresión diferencial de estos componentes, siendo mayor el contenido de estas proteínas en células tumorales respecto a las células normales. Cuando analizamos la proliferación de las células tumorales inhibiendo la activación del sistema Notch, observamos una disminución de la misma de forma dosis-dependiente, lo cual estuvo acompañando por una disminución de la síntesis de progesterona y estradiol. Al inhibir la activación del sistema Notch en culivos de células KGN, se produjo un aumento en el clivaje y activación de la proteína PARP, principal sustrato de la caspasa 3 (efectora principal de la apoptosis) y un aumento en proteínas proapoptóticas como BAX y BCLXcorto. En cambio, no se observaron cambios en proteínas antiapoptóticas como BCL2 o BCLXLargo. Además, detectamos un aumento en el clivaje y activación de la proteína caspasa 8, pero no se vieron diferencias en cuanto a los niveles del sistema de membrana, FAS y FASL. Al estudiar una de las principales vías de supervivencia celular; PI3K/AKT, observamos una disminución en la fosforilación de la proteína AKT, denotando una disminución en la activación de esta vía en esta línea tumoral en ausencia de la activación de Notch. Posteriormente, analizamos la migración celular y observamos que las células disminuyen su capacidad migratoria cuando inhibimos el sistema Notch y este parámetro celular también se vió afectado cuando las células se incubaron en presencia de un inhibidor de la activación de la vía PI3K/AKT.

Los resultados obtenidos hasta el momento, nos sugieren que el sistema Notch sería un promisorio blanco, ya que afectando su actividad se alteran parámetros fundamentales del comportamiento tumoral de la línea KGN que contribuyen a su malignidad y tumorigenicidad. Además, estos resultados demuestran que el sistema Notch se encuentra involucrado en la proliferación y apoptosis, como en la síntesis de esteroides de las células KGN. Asimismo, este sistema posee alguna función en la capacidad migratoria de estas células tumorales y, al menos algunos de estos efectos podrían estar dados por interacción del sistema Notch con la vía de señalización intracelular PI3K/AKT.

En conclusión, el sistema Notch protegería a las células de la granulosa ovárica tumorales humanas, y al presentarse mayormente expresado en estas células respecto de su contraparte normal, sería un candidato a ser

considerado como blanco terapéutico para futuras terapias antitumorales en tumores de ovario de granulosa con las características mencionadas.

ABSTRACT

Ovarian granulosa cell tumors (GCTs) represent 3-5% of all ovarian malignancies. Treatments have limited proven efficacy and biologically targeted treatment is lacking. Our aim was to investigate the role of Notch signaling on the proliferation, steroidogenesis, apoptosis, and PI3K/AKT pathway in a tumor granulosa cell line (KGN). A human tumor granulosa cell line (KGN) was incubated in the presence of an inhibitor of the g-secretase complex (DAPT) to investigate the role of Notch signaling in cellular parameters associated to cell growth and death. Also, the expression of some Notch members were studied in KGN cell line and human granulosa cells. Proliferation, steroidogenesis, apoptotic parameters and AKT phosphorylation were determined in the cultures of KGN cells in the presence of DAPT.

In the present work we observed that JAGGED1, NOTCH1 and NOTCH4 are highly expressed in tumor granulosa cells (KGN) compared to normal granulosa cells. The proliferation of KGN cells decreases in the presence of DAPT 20 μ M and also progesterone and estradiol production. Apoptotic parameters like PARP cleavage, BAX, BCLXshort and caspase 8 cleavage increased in KGN cells in culture with DAPT, while others did not change (BCL2, BCLXlong, FAS and FASL). AKT phosphorylation decreased when Notch signaling was inhibited.

Conclusion: Notch system acts as an oncogenic pathway in an ovarian tumor granulosa cell line (KGN). Notch induces granulosa cell proliferation, participates in steroid synthesis and decreases pro-apoptotic parameters. Notch signaling might be interacting with PI3K/AKT pathway intensifying the importance of Notch oncogenic role in this type of tumors.



CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENOTIPOS DE *HELICOBACTER PYLORI* EN ESPECÍMENES BUCALES MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Medina, Myriam L^{1,2}, Romero Silvana³, Anríquez Cristina³, Marin Héctor M², Medina Marcelo G², Lamas Gabriela S.⁴, Billordo Ariel³, Mosqueda Nancy³, Merino Luis A².

¹Unidad de Investigación. Hospital Pediátrico Dr. Avelino Castellán; ²Instituto de Medicina Regional. Universidad Nacional del Nordeste; ³Servicio de Gastroenterología. Hospital Dr. Julio C. Perrando; ⁴Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Dr. Julio C. Perrando.

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es un importante patógeno humano que causa gastritis crónica, úlcera péptica y gastritis atrófica. Este microorganismo es considerado el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico.(1,2,3,4,5) La infección solo ocurre en el 15% de las personas infectadas, siendo influenciada su aparición, por la virulencia de la especie infectante, la susceptibilidad genética del hospedero y la presencia de cofactores ambientales.(6,7) Recientemente se han descrito genes bacterianos específicos que están asociados con la virulencia de las especies bacterianas.(8,9,10) Entre un 60% a 70% de las especies de *H. pylori* contienen un gen denominado cag A (gen asociado a la citotoxina), que codifica para una proteína de 128 kDa denominada cagA. (11) La presencia de cagA está relacionada con úlcera duodenal, atrofia de la mucosa gástrica y cáncer gástrico. (11) Este gen representa parte de una gran entidad genómica denominada isla de patogenidad,(11) la cual contiene múltiples genes relacionados con la virulencia y patogenidad de las especies de *H. pylori*. De esta manera, la presencia de cagA puede ser considerada como un marcador de la isla de patogenidad, que está relacionada con una mayor virulencia en las especies que la presentan.(12) Otro factor de virulencia producido por aproximadamente un 50% de las especies de *H. pylori*, es una citotoxina que induce la muerte celular.(13) Esta toxina es codificada por el gen *VacA*, presente en prácticamente todas las especies de *H. pylori*. Ha sido reportada la existencia de diferentes variantes alélicas en dos partes de este gen. La región señal N terminal (s) ocurre como alelos s1a, s1b o s2 . La región media (m), está presente como alelos m1 o m2. Esta estructura de mosaico de este gen

ocurre por las diferencias en la producción de citotoxinas entre las especies. Las especies tipo s1/m1 producen altos niveles de toxina, las especies tipo s1/m2 producen de bajo a moderado niveles de toxinas activas, mientras que las especies tipo s2/m2 no producen ninguna toxina activa. Las especies s2/m1 han sido muy poco reportadas.(14)

Las regiones vacA s y m parecen tener diferente relevancia clínica.(15) Al respecto, las especies vacA s1a están más asociadas con la presencia de un infiltrado de linfocitos y neutrófilos en la mucosa del antro, que los tipos s1b o s2. Las especies vacA m1 están más asociadas con daños al epitelio gástrico que las especies m2, mientras que las úlceras duodenales son más prevalentes en pacientes infectados con especies tipo s1a que con pacientes colonizados por especies tipo s1b o s2.

La cavidad bucal ha sido propuesta como un reservorio de infección de *H. pylori*, usando datos provenientes de una variedad de técnicas empleadas, con resultados muy variables (16,17,18). Algunos estudios han demostrado frecuentemente la presencia de *H. pylori* en muestras de la cavidad bucal, particularmente de placa dental(19,20). Otros lo han observado solo en aislamientos ocasionales(21), y muchos han fallado para demostrar la presencia del microorganismo en la cavidad bucal(22,23). Estos resultados conflictivos en la incidencia de *H. pylori* en la placa dental, pueden ser explicados por diferencias en los métodos de recolección de muestras y técnicas de detección o por contaminación causada durante la endoscopia o por el reflujo gástrico.

La prevalencia de la infección varía notablemente en todo el mundo, con una tasa del 40 al 50% en los países desarrollados y cerca del 90% en aquellos países en vías de desarrollo. El modo de transmisión de *H. pylori* es ampliamente discutido.(24) Aunque algunas evidencias sugieren que este ocurre predominantemente por contacto de persona a persona, otros autores proponen la vía fecal-oral. Más recientemente ha sido sugerido que la bacteria puede existir de forma natural en el ambiente (25). Actualmente, las evidencias a favor y en contra de la transmisión vía oral-oral del microorganismo son muy debatidas. De esta forma tanto la saliva como la placa dental han sido implicadas como posibles vías de adquisición de la infección por *H. pylori*. En muchos casos pacientes con resultados positivos a nivel de biopsias de estómago son también positivos a nivel de placa dental, pero otros pacientes no presentan coinfección a nivel bucal. Estos resultados son realmente muy inconsistentes, y no están relacionados con la gran prevalencia a nivel mundial que ha sido demostrada a nivel de estómago. Es importante referir que como fue señalado anteriormente los reportes sobre la prevalencia de

H. pylori en cavidad bucal son muy conflictivos. De hecho existen estudios con una alta prevalencia y otros que indican no haber podido demostrar su presencia en cavidad bucal. Algunas investigaciones señalan que aun manteniendo las condiciones de la toma de la muestra, método de extracción de ADN, las condiciones del ensayo de reacción en cadena de la polimerasa y los primers utilizados, existen diferencias. Por lo que se concluye que la razón de estas diferencias radicaría en la muestra debido a la cantidad de microorganismos alojados en la cavidad bucal de estos sujetos, lo que hace presumir que la presencia del microorganismo en la cavidad bucal no tiene una prevalencia muy alta en algunas poblaciones estudiadas. No obstante, deben ser realizadas más investigaciones ampliando el número de pacientes con la finalidad de complementar los datos referentes a la presencia de *H. pylori* en la cavidad bucal de sujetos. Debido a que a través de los estudios que se han realizado, hasta el momento no se ha podido identificar y caracterizar los genotipos de *H. pylori* más frecuentes a nivel de cavidad bucal en pacientes adultos, es que se decidió llevar a cabo la presente investigación. Por lo que los hallazgos obtenidos con este estudio permitirían efectuar cuando este indicado un tratamiento erradicador de esta bacteria carcinogénica, evitando las graves consecuencias de la evolución de la enfermedad no tratada oportunamente.

El objetivo de este estudio fue identificar y caracterizar los genotipos de *H. pylori* de cavidad bucal en un grupo de muestras provenientes de pacientes adultos dispépticos con indicación de videoendoscopia alta.

MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de muestras

Se seleccionaron muestras de placa dental y saliva pertenecientes a pacientes dispépticos adultos con indicación de endoscopia digestiva alta, las cuales estaban freezadas en el Instituto de Medicina Regional de la Universidad Nacional del Nordeste.

Técnicas

Procesamiento de *H. pylori* por PCR:

Para la detección de ADN de *H. pylori* de las muestras, estas fueron agitadas. La suspensión fue lavada con agua estéril y centrifugadas a 12000X g por 3 min. El pellet resultante fue resuspendido en 500ul de buffer de lisis

(100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 25nM EDTA, 0,5% dodecilsulfato de sodio), y 10 ul de proteinasa K (10mg/ml) fue añadido. La incubación se realizó a 50°C por 20 h; esto fue seguido por la extracción con fenol cloroformo y precipitación con etanol. El pellet resultante fue disuelto en 100 ul de buffer TE (10 mM), Tris-HCl [pH 7.4], 0.1 mM EDTA [pH 8.0] por 20 h a 37° C. Las muestras fueron mantenidas a -20°C hasta su posterior procesamiento.

La detección de *H. pylori* en placa dental y saliva se llevó a cabo por medio de la Técnica de PCR. Para ello se utilizaron los primers del gen urease-A de la bacteria (HPU1:5'GCC ATT GGT AAA TTA GTT 3' y HPU2:5'CTC CTT AAT TGT TTT TAC 3') y su visualización se realizó por electroforesis en gel de azarosa al 1,5 % teñido con bromuro de etidio y fotografiado bajo luz UV.

Los ciclos de amplificación fueron realizados en un termociclador o sistema de amplificación (Perkin-Elmer, Foster City, CA) Las condiciones para la RCP fueron de 35 ciclos a 94°C por 1 min, 72°C por 1 min, y una extensión final de 72°C for 6 min.

Los productos amplicados de la RCP fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa. Una alícuota de 6ul (5 µl de cada producto amplificado, le fueron añadidos 1ul de buffer de muestra) (20 ml de glicerol 50%, 25 mg de azul de bromofenol, 3 gotas de 1 N NaOH) y se realizó la electroforesis con geles preparados al 2%, los cuales fueron teñidos con bromuro de etidio (0.5 ug/ml).

RESULTADOS

Se seleccionaron 54 muestras orales; 39 saliva y 15 placas dentales, todas resultaron negativas por PCR. Todos las muestras pertenecieron a pacientes adultos con edades entre 19 y 69 años, quienes tuvieron como criterio diagnóstico dispepsia funcional según criterio (Roma III), presentando como síntomas: plenitud postprandial, saciedad precoz, dolor epigástrico y ardor epigástrico. De acuerdo al estudio anatomopatológico 4 de ellos tenía biopsias gástricas que resultaron positivas para *H.pylori*, todos presentaron Gastritis Crónica Activa Moderada vinculable a la presencia de *H. pylori*. De dichas muestras de biopsias gástricas positivas para *H.pylori* 3 fueron genotipo Vac A m1 y la restante fue genotipo Cag A.

DISCUSIÓN

Muchos autores han hallado con éxito ADN de *H. pylori* por PCR en placa dental (26), saliva (26, 27), dorso de la lengua (26), la superficie de ulceraciones orales o neoplasia oral (28) llamando la atención sobre la importancia de la posible la transmisión oral. Hasta el momento, la asociación entre la colonización simultánea de *H. pylori* en la cavidad bucal y que en el estómago no ha sido establecida. Asimismo, varios autores han sugerido que para la detección de *H. pylori* en la cavidad bucal se usen protocolos de PCR (29) apoyando la hipótesis que la cavidad bucal es un reservorio para la re-infección gástrica por este microorganismo, aunque esta suposición aún permanece polémica. Por otra parte, algunos estudios han especulado sobre que *H. pylori* podría ser un organismo comensal por lo que su presencia no sería un medio para que la infección ocurriera en el estómago (30). Por su parte, otros investigadores han sugerido que *H. pylori* a veces coloniza la placa dental, pero que tal colonización parece ser transitoria porque el microorganismo pasa a través de la cavidad bucal al estómago (31). La verdad es que el número de organismos necesarios de *H. pylori* para causar la infección o la enfermedad en el estómago es desconocido. Además no está claro si la presencia de la bacteria en la boca es transitoria o no, si existen factores de riesgo adicionales que favorecen el crecimiento de *H. pylori* en la cavidad bucal, o si hay un número de microorganismos suficientes en la placa dental que serviría como reservorio para la re-infección de la mucosa gástrica en pacientes susceptibles, después de la erradicación con antibióticos de la infección gástrica. Numerosos estudios usando PCR han sido realizados en varias partes del mundo, los cuales han mostrado resultados contradictorios en términos de frecuencia de detección de *H. pylori* en la cavidad bucal con un rango entre 0 y 100 % (32,33). Esta amplia variación es probablemente debido al tipo de población estudiada, y las diferencias en la especificidad y sensibilidad de los primers empleados con los test de PCR. (34)

Existe una clara asociación entre infección por *H. pylori* con gastritis, úlcera duodenal o gástrica y el desarrollo del cáncer gástrico.(35) Sin embargo, la asociación entre la detección de *H.pylori* en cavidad oral y patologías gástricas asociadas con *H.pylori* es controversial.(36,37,38) Esto es en parte debido al limitado éxito del cultivo de *H.pylori* a partir de muestras orales en contraste con los cultivos satisfactorios a partir de biopsias gástricas.(39) Los avances en la tecnología molecular han conducido al empleo estándar de técnicas de PCR para la detección de patógenos teniendo en cuenta para

una rápida caracterización y detección del pequeño número de bacterias específicas usando primers específicos para la amplificación de una región específica de ADN de la especie. Hasta el momento, diferentes primers y protocolos de PCR han sido usados para detectar *H. pylori* de muestras de cavidad bucal, pero los resultados han sido muy variables (34,37,38). Mientras algunos estudios mostraron un bajo o ningún *H. pylori*, en otros estudios la detección en cavidad bucal mostró altos rangos de detección (32,33,34). Asimismo no hubo ninguna consistencia entre el aislamiento de *H. pylori* de biopsias gástricas y la detección de la bacteria en la cavidad bucal en el mismo grupo de estudio (36,37). Nuestros resultados coinciden con estos hallazgos en los que aún no se pudo establecer si existe o no asociación entre la infección por *H.pylori* entre cavidad oral y mucosa gástrica. Algunos autores señalan que la inconsistencia de estos resultados es probablemente debido al tipo de muestra oral analizada (placa dental vs. saliva), a la especificidad y la sensibilidad de los primers usados para la detección de *H. pylori* por PCR, y a las cohortes estudiadas. Tal variabilidad en los resultados ha impedido a investigadores estudiar, analizar y comparar las infecciones de ambos sitios anatómicos y mucho menos cualquier asociación entre la detección de *H.pylori* en cavidad oral y cualquier patología gástrica.(36,37)

En algunos estudios, los resultados claramente mostraron la asociación de infección gástrica por *H. pylori* con dispepsia no ulcerosa y enfermedad por reflujo gastroesofágico. No habiendo ninguna diferencia estadística en la detección de *H. pylori* entre muestras de biopsias gástricas y muestras de placa dental de pacientes con cualquier enfermedad gastroesofágica. Según algunos autores, en términos de los dos tipos de muestras orales usadas en el estudio, *H. pylori* fue hallado mejor en muestras de placa dental que de saliva, probablemente debido al hecho que la placa dental proporciona una matriz sólida que permite a la bacteria mantener la adhesión, mientras el flujo continuo y la producción constante de saliva previene el establecimiento de una carga bacteriana suficiente lo que dificulta la detección bacteriana. (39) Es también importante tener en cuenta la especificidad y la sensibilidad de los primers seleccionados, sobre todo de regiones como la boca donde hay una complejidad en la microflora oral.(39) Asimismo en algunos estudios se halló una fuerte asociación entre la presencia de *H. pylori* hallado en la cavidad bucal con el hallado en las patologías gastroesofágicas (dispepsia no ulcerosa, Enfermedad por reflujo gastroesofágico y cáncer gástrico), mientras que no hubo ninguna detección de *H. pylori* en la cavidad bucal de los sujetos sanos u con otras patologías no gástricas. Algunos autores apoyan la teoría que la

cavidad bucal, y más específicamente la placa dental es un reservorio para *H. pylori* persistiendo durante mucho tiempo y siendo responsable de la transmisión oral de la bacteria a la cavidad gástrica (29), y posiblemente sirviendo como una fuente de re-infección después del tratamiento de erradicación (30). Sin embargo, es poco probable ya que el número de bacteria descubierta en la placa dental es muy pequeño (31). Algunos autores señalan que la infección de cavidad bucal por *H. pylori* es secundaria a dispepsia no ulcerosa y enfermedad por reflujo gastroesofágico como el resultado de reflujo gástrico, un síntoma común en este tipo de enfermedades. Algunos estudios mostraron que hay una fuerte y clara asociación entre la presencia de *H. pylori* en la cavidad bucal y la enfermedad gastroesofágica asociada con este microorganismo, mientras que los sujetos sanos y aquellos con otra enfermedad no gástrica no presentaron *H. pylori* en su cavidad bucal. Nuestros hallazgos no pudieron confirmar estos estudios debido a que todas las muestras tanto de placa dental como de saliva resultaron negativas aún en aquellos pacientes con resultados de biopsias gástricas positivas para *H.pylori* y con alguna patología gástrica. Algunos autores, sugieren que en cavidad bucal se efectuó la detección de *H. pylori* por PCR siendo este un método indirecto de diagnóstico de enfermedad gastroesofágica asociada a *H. pylori*, motivo por el cual se decidió en este estudio emplear dicho método.(40)

La placa dental y la saliva han sido reservorios para al menos 400 especies diferentes de bacterias y son un potencial reservorio para microorganismos infecciosos.(41) La presencia de *H. pylori* en la saliva y placa dental varía del 38 a 86 % y este valor puede ser más alto en el desarrollo de patologías gástricas.(42) Asimismo, el rol del *H.pylori* en la cavidad oral es controversial, teniendo para otros autores un rango de detección de 0-100 % , siendo el reflujo gastroesofágico, deficiencias en la higiene oral, condiciones que podrían facilitar la colonización oral.(43)

Muchos autores han planteado que sólo unas pocas personas infectadas por *H.pylori* desarrollan enfermedad gástrica, estando este evento relacionado con la expresión de la virulencia de los genes *vacA* y *cagA*. El *vacA* s1 y m1 están asociados con daño epitelial , úlcera péptica y cáncer gástrico. (44) El gen *VacA* es uno de los genes más estudiados relacionado con la patogénesis de la mucosa gástrica pero los datos publicados de la presencia de este gen en cavidad oral son escasos.(45,46)

Nuestro estudio coincidió con un trabajo que señala que la cavidad oral podría no ser un reservorio para *H.pylori* en pacientes con dispepsia funcional. (45) El hallazgo negativo de *H.pylori* en cavidad oral de nuestros pacien-

tes podría explicarse por inóculo insuficiente o ausencia de *H.pylori*. Nuestros estudios coincidieron con aquellos estudios previos que señalan ausencia de *H.pylori* en la cavidad oral, no siendo posible detectar genotipos patogénicos en ningún tipo de muestra oral. (47) Estos resultados fueron similares a otros previos donde enfatizaron la ausencia de esta bacteria en el medio oral de la población estudiada. Asimismo, estos resultados coincidieron con aquellos que mostraron que no existe correlación entre la presencia de infección por *H.pylori* en la cavidad oral y estómago.(45) Algunos investigadores han determinado que la salud oral y las prácticas de higiene oral no tienen ninguna influencia sobre la eficacia de la erradicación del *H.pylori* del estómago.

Si bien no se logró identificar ni caracterizar los genotipos de *H.pylori* de cavidad bucal en estas muestras, debido a que ninguna resultó positiva para este microorganismo en cavidad bucal, sería necesario incrementar el número de muestras con el fin de poder sospechar de una infección gástrica mediante la detección del microorganismo en la cavidad oral con el beneficio para la prevención de patologías gástricas asociadas a la presencia de *H.pylori*. Asimismo, este trabajo podría servir de partida a nuevos y más amplios estudios que estudien si existe o no correlación entre ambos nichos para la bacteria.

RESUMEN

Introducción: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es el principal factor de riesgo de cáncer gástrico, variando el tipo de daño gástrico según el genotipo de *H.pylori*. Las técnicas moleculares permiten detectar el microorganismo en cavidad bucal. **Objetivo:** Identificar y caracterizar los genotipos de *H.pylori* de cavidad bucal en un grupo de muestras provenientes de pacientes adultos con indicación de videoendoscopia alta. **Material y métodos:** Se seleccionaron muestras bucales de placa dental y saliva. Se aplicó la metodología de Reacción en cadena de la Polimerasa para su procesamiento.

Resultados: De las 54 muestras orales seleccionadas; 39 de saliva y 15 placas dentales, todas resultaron negativas. **Conclusiones:** No se logró identificar ni caracterizar los genotipos de *H.pylori* de cavidad bucal en estas muestras, debido a que ninguna resultó positiva para este microorganismo. Sería necesario incrementar el número de muestras para poder evaluar la importancia de la presencia de *H.pylori* en cavidad oral.

Palabras clave: genotipificación, *H.pylori*, placa dental, saliva.

ABSTRACT

Introduction: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is the principal factor of risk of gastric cancer, changing the type of gastric hurt according to *H.pylori*'s genotype. The molecular technologies allow to detect the microorganism in mouth cavity. **I target:** Identify and to characterize *H.pylori*'s genotypes of mouth cavity in a group of samples from dyspeptic adult patients with indication of videoendoscopía discharge. **Material and methods:** there were selected mouth samples of dental plaque and saliva. There was applied the methodology of Chain reaction of the Polymerase for his processing. **Results:** Of 54 oral selected samples; 39 of saliva and 15 dental plaques they all turned out to be negative. **Conclusions:** it was achieved to identify neither to characterize *H.pylori*'s genotypes of mouth cavity

Key words: genotipificación, *H.pylori*, dental plaque, saliva.

REFERENCIAS

1. Graham DY, and Go M: *Helicobacter pylori*: current status. Gastroenterology (1993); 105:279-282
2. Hardo PG, Tugnait A, Hassan F, Lynch DAF, West AP, Mapstone NP et al.: *Helicobacter pylori* and dental care. Gut (1995); 37:44-46.
3. Hopkins R, Girardi LS, and Turney EA: Relationship between *Helicobacter pylori* eradication and reduced duodenal and Gastric ulcer recurrence: A Review. Gastroenterology (1996); 110: 1244-1252.
4. Dunn B.E .,Cohen H, Blaser MJ: *Helicobacter pylori* Clin Microbiol Rev(1997);10:72041.
5. Dunn B.E .,Cohen H, Blaser MJ: *Helicobacter pylori* Clin Microbiol Rev(1997);10:72041.
6. Atherton JC: *H. pylori* virulence factors. British Medical Bulletin (1998); 54: 1012-1020.
7. Blaser M.J: Not all *Helicobacter pylori* strains are created equal: should all be eliminated? Lancet (1997); 349:1020-22
8. Mobley, H.L: Defining *Helicobacter pylori* as a pathogen: strain heterogeneity and virulence. Am J. Med (1996); 100: 2S-11S
9. Censini, S, Lanfge C, Xiang Z, et al: *cagA* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and diasease-associated virulence factors. Proc Natl Acad Sci USA (1996); 14648-53.
10. Van Doorn LJ, Figuereido C, Rossau R, Jannes, G, As broeck M, Sousa,

- JC, Carneiro F and Quint reverse WG: Typing of *helicobacter pylori* vac A and Detection of cag A Gene by PCR Reverse Hybridization. J. Clin. Microbiol (1998);36(5): 1271-1276
11. Leunk, R.D., P.P. Johnson, B.C. David, W.G. Kraft and D. R. Morgan: Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. J. Med. Microbiol (1998); 2693-99
 12. Atherton JC, Cap P, Peek, RM Jr, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL: Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori* : association of specific vac A type with cytotoxin production and peptic ulceration. J Biol Chem (1995); 270: 1771-1778
 13. Atherton J.C, Cao P, Peek RM, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ: Clinical and pathological importance on heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology (1997); 112:92-99
 14. Kradjen S, Fuksa M, Anderson J, Kempstone L, Boccia A, Petrea C et al: Examination of human stomach biopsies, saliva, and dental plaque for *Campylobacter pylori*. J Clin Microbiol (1989) 27: 1397-98.
 15. Kradjen S, Fuksa M, Anderson J, Kempstone L, Boccia A, Petrea C et al: Examination of human stomach biopsies, saliva, and dental plaque for *Campylobacter pylori*. J Clin Microbiol (1989) 27: 1397-98.
 16. Madmujar P, Shah SM, Dhunjiboy KR, Desai HG: Isolation of *Helicobacter pylori* from dental plaques in healthy individuals. Ind J Gastroenterol (1990); 9:271-272
 17. Banatvala N, Lopez CR, Owen R , Ardi Y, Davies G, Hardie J et al: *Helicobacter pylori* in dental plaque. Lancet (1993); 341-380.212
 18. Dowsett SA; Archila L; Segreto VA; Gonzalez CR; Silva A; Vastola KA et al: *Helicobacter pylori* infection in Indigenous Families of Central America: Serostatus and Oral and Finger nail Carriage. J Clin Microbiol. (1999); 37: 2456-2460.
 19. Mapstone NP, Lynch DAF, Lewis FA, Axon ATR, Tompkins DS, Dixon MF et al: Identification of *Helicobacter pylori* DNA in the mouths and stomachs of patients with gastritis using PCR. J Clin Pathol (1993);46:540-543.
 20. Mendall MA, Northfield T: Transmission of *Helicobacter pylori* infection. Gut (1996); 37:1-3.
 21. Sasaki K, Tajiri Y, Sata M, Fujii Y, Matsubara F, Zhao M et al: *Helicobacter pylori* in the natural environment. Scand J Infect Dis (1999); 31: 275-79.
 22. López Brea M, Alarcón T, Mégraud F: Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Current Opinion in Gastroenterology (1997);13:13-1915.
 23. Hammar M, Tyszkiewicz T, Wadstrom T, O' Toole PW: Rapid detection of

- Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polimerase chain reaction. J Clin Microbiol (1992);30:54-58
24. Ferguson D, Li C, Patel N, Mayberry W, Chi D, Thomas J: Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. J Clin Microbiol (1993); 31:2802-2804.
 25. Khandaker K, Palmer KR, Eastwood MA, et al: DNA fingerprints of *Helicobacter pylori* from mouth and antrum of patients with chronic ulcer dyspepsia. Lancet (1993);342:751.
 26. Souto R, Colombo APV. Detection of *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction in the subgingival biofilm and saliva of non-dyspeptic periodontal patients. J Periodontol 2008; 79: 97–103.
 27. Czesnikiewicz-Guzik M, Bielanski W, Guzik TJ, Loster B, Konturek SJ. *Helicobacter pylori* in the oral cavity and its implications in gastric infection, periodontal health, immunology and dyspepsia. J Physiol Pharmacol 2005; 56: 77–89
 28. Okuda K, Ishihara K, Miura T, Katakura A, Noma H, Ebihara Y. *Helicobacter pylori* may have only a transient presence in the oral cavity and on the surface of oral cancer. Microbiol Immunol 2000; 44: 385–388.
 29. Pytko-Polonczyk J, Konturek SJ, Karczewska E, Bielanski W, Kaczmarczyk-Stachowska A. Oral cavity as permanent reservoir of *Helicobacter pylori* and potential source of reinfection. J Physiol Pharmacol 1996; 47: 121–129.
 30. Desai HG, Gill HH, Shankaran K, Metha PR, Prabhu SR. Dental plaque: a permanent reservoir of *Helicobacter pylori*? Scand J Gastroenterol 1991; 26: 1205–1208.
 31. Song Q, Haller B, Ulrich D, Wichelhaus A, Adler G, Bode G. Quantitation of *Helicobacter pylori* in dental plaque samples by competitive polymerase chain reaction. J Clin Pathol 2000; 53: 218–222.
 32. Oshowo A, Tunio M, Gillam D, Botha AJ, Holton J, Boulous P. Oral colonization is unlikely to play an important role in *Helicobacter pylori* infection. Br J Surg 1998; 85: 850–852.
 33. Dowsett SA, Kowolik MJ. Oral *Helicobacter pylori*: can we stomach it? Crit Rev Oral Biol Med 2003; 14: 226–233.
 34. Kabir S. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in feces and saliva by polymerase chain reaction: a review. Helicobacter 2004; 9: 115–123.
 35. Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru MKR, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. J Biol Chem 1995; 270: 1771–1777.

36. Loster BW, Majewski SW, Czesnikiewicz-Guzik M, Bielanski W, Pierzchalski P, Konturek SJ. The relationship between the presence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity and gastric in the stomach. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57: 91–100.
37. Teoman I, Ozmeric N, Ozcan G et al. Comparison of different methods to detect *Helicobacter pylori* in the dental plaque of dyspeptic patients. *Clin Oral Investig* 2007; 11: 201–205.
38. Tiwari SK, Khan AA, Ahmed KS et al. Rapid diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients using salivary secretion: a non-invasive approach. *Singapore Med J* 2005; 46: 224–228.
39. Morales-Espinosa R, Castillo RG, Gonza'lez-Valencia G et al. Colonization of Mexican patients by multiple *Helicobacter pylori* strains with different *vacA* and *cagA* genotypes. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3001–3004.
40. Morales-Espinosa R, Fernandez-Presas A, Gonzalez-Valencia G, Flores-Hernandez S, Delgado-Sapien G, Mendez-Sanchez JL, et al. *Helicobacter pylori* in the oral cavity is associated with gastroesophageal disease. *Oral Microbiol Immunol* 2009; 24: 464–468.
41. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Dibart S. Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. *J Clin Periodontol* 1991; 18: 766–75.
42. Liu Y, Lin H, Bai Y, Qin X, Zheng X, Sun Y, et al. Study on the relationship between *Helicobacter pylori* in the dental plaque and the occurrence of dental caries or oral hygiene index. *Helicobacter* 2008; 13: 256–60.
43. Medina ML, Medina MG, Martin GT, Picón SO, Bancalari A, Merino LA. Molecular detection of *Helicobacter pylori* in oral samples from patients suffering digestive pathologies. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010; 15: 38–42.
44. Atheron JC, Cao P, Peek RM jr, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicim in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995; 270: 17771–7.
45. Silva Rossi Aguiar VP, Navarro-Rodriguez T, Mattar R, Siqueira de Melo Peres MP, Correa Barbuti R, Silva FM, et al. Oral cavity is not a reservoir for *Helicobacter pylori* in infected patients with functional dyspepsia. *Oral Microbiol Immunol* 2009; 24: 255–9.
46. Wang J, Chi Ds, Laffan JJ, Li C, Fergunson DA jr. , Litchfield P, et al. Comparison of cytotoxin genotypes of *Helicobacter pylori* in stomach and saliva. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 1850–6.

47. Olivier BJ, Bond RP, Zyl WB, et al. Absence de *Helicobacter pylori* within the oral cavities of members of a healthy South African community. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 635-636.



LA HISTAMINA COMO MODULADOR DE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE LEYDIG TESTICULARES. MEDIADORES INTRACELULARES INVOLUCRADOS Y POSIBLE PAPEL EN LA ETIOLOGÍA TUMORAL.

Carolina Mondillo

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

Los tumores de células de Leydig (TCL) son los tumores estromales de testículo más frecuentes [1]. Presentan dos picos de incidencia, el 20% en niños y el 80% en adultos [2]. No hay sintomatología específica asociada a los TCL. Con frecuencia producen andrógenos, pero también pueden secretar estradiol, causando un desarrollo excesivo del tejido mamario (ginecomastia) [2, 3]. Los pacientes con TCL suelen presentar además disfunción eréctil, disminución de la libido, oligozoospermia, distribución femenina del vello púbico y/o atrofia testicular. En niños puede presentarse pubertad precoz [4, 5].

La etiología de los TCL en humanos es aún desconocida. Son normalmente benignos, pero un 10% tiene evolución maligna, pudiendo diseminarse a los ganglios linfáticos del abdomen, hígado, pulmón, hueso y cerebro [1, 3]. Si bien los TCL benignos tienen pronóstico favorable, el tratamiento clásico es la orquiectomía (extracción del testículo por vía inguinal), pudiendo complementarse con quimioterapia y/o radioterapia según el estadio del tumor. Esto conlleva importantes consecuencias físicas y psicológicas [3, 4], comprometiéndose la fertilidad del paciente de manera temporal o permanente. Por otro lado, la sobrevida promedio de los pacientes con tumores metastáticos de células de Leydig es de dos años, ya que no responden bien a la quimioterapia ni a la radioterapia [1]. Se requiere por lo tanto de nuevas alternativas terapéuticas para mejorar la calidad de vida y sobrevida de los pacientes con TCL, como así también para preservar su fertilidad. En este sentido, los trabajos de investigación de los últimos años han apuntado a identificar factores que puedan ser utilizados como herramienta para interferir con el crecimiento tumoral y/o su malignización [1, 8, 9].

La histamina (HA) es una amina biogénica que participa en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos, tales como la regulación de las respuestas inmune e inflamatoria, secreción de jugos gástricos, cognición, neurotransmisión, nocicepción, hematopoyesis, regeneración de teji-

dos, cicatrización, entre otros [10]. Se sintetiza a partir del aminoácido L-histidina, en una reacción catalizada por la enzima L-histidina descarboxilasa (HDC) [11]. Se han identificado hasta el momento cuatro subtipos de receptores histaminérgicos, designados: HRH1, HRH2, HRH3 y HRH4. Todos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), pero se diferencian en su patrón de expresión y mecanismos de transducción de la señal [12]. Así, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, el efecto final de HA estaría definido por el subtipo de receptor con el que ésta interactúa en la membrana de sus células blanco [13].

La expresión y actividad de HDC se encuentra aumentada en tejidos tumorales [14], sugiriendo la participación de la HA en la generación y el crecimiento de tumores. Al respecto, se han reportado efectos proliferativos de la HA en líneas celulares derivadas de tumores colorrectales, de mama, de melanoma y de astrocitoma humanos [15, 16]. En células de melanoma humano, la inhibición de la expresión de la HDC por transfección de oligonucleótidos antisentido disminuye significativamente la proliferación celular, indicando que la HA ejerce un efecto trófico paracrina [17]. Antagonistas HRH2, como la cimetidina y la ranitidina, han sido utilizados con éxito diverso en el tratamiento de cáncer gástrico, de mama, colorrectal, melanomas y glioblastomas [14, 15, 18]. Por su parte, el antagonista HRH1 terfenadina es capaz de inhibir significativamente la proliferación de las líneas celulares de melanoma murino B16F10 y humano A375 *in vitro* e *in vivo* [19]. Interesantemente, numerosos trabajos han reportado que la HA podría favorecer el desarrollo de tumores a través de la regulación de la respuesta inmune y la estimulación de la angiogénesis tumoral [13].

Como se indicó previamente, los tratamientos antineoplásicos tradicionales como la radioterapia o la quimioterapia presentan elevada toxicidad, y no son eficaces en todos los pacientes con TCL. Así, el empleo de fármacos no tóxicos con actividad antitumoral, en forma aislada o en combinación con otras terapias antineoplásicas, podría no sólo prolongar la supervivencia de estos pacientes, sino también incrementar las posibilidades de llevar a cabo una tumorectomía en reemplazo de la cirugía radical, lo cual contribuiría a preservar su fertilidad.

El objetivo general del proyecto de investigación desarrollado fue estudiar el efecto de la HA sobre la proliferación de células de Leydig normales y tumorales, como así también los mecanismos de señalización involucrados, a fin de determinar la posible participación de HA en el desarrollo de tumores de células de Leydig e identificar, a futuro, potenciales moléculas blanco de

terapia antitumoral.

Los resultados obtenidos indican que la línea tumoral MA-10 es capaz de sintetizar HA. Al respecto, se observó una importante expresión de HDC y contenido endógeno de HA por inmunocitoquímica en estas células, y se detectó además actividad de HDC. Se demostró también que la HA cumpliría un papel en la estimulación autócrina y/o paracrina de la proliferación de la línea MA-10, al menos a través de la activación de su receptor HRH2 y el incremento rápido y transitorio en los niveles intracelulares de AMPc. Por el contrario, un aumento sostenido en los niveles de AMPc inducido por forskolina (estimulador directo de la enzima adenilato ciclasa) tendría un efecto inhibitorio sobre la proliferación de dichas células.

A su vez, se demostró la participación de ERK en el mecanismo de acción de HA, en concordancia con las publicaciones que describen que la activación de proteínas Gs por factores con acción mitogénica conduce a un incremento en la fosforilación de ERK, y con trabajos previos del laboratorio reportando el acople de H2R a la vía adenilato ciclasa (AC)/AMPc/PKA mediante una proteína Gs [20, 21].

También se llevaron a cabo ensayos de proliferación *in vitro* en células de Leydig inmaduras normales de rata (CLI), y en células de Leydig TM3. En contraste con lo observado para la línea MA-10, la activación selectiva del receptor HRH2 no tuvo efecto sobre la proliferación de las CLI o TM3. Sin embargo, el tratamiento con un agonista específico del receptor HRH4 mostró un claro efecto inhibitorio. Esta acción diferencial de la HA sobre células de Leydig normales y tumorales en cuanto a la regulación de la proliferación celular podría estar asociada a diferencias en los niveles de expresión de HDC entre ambos modelos, dado que se observó sobreexpresión de HDC en las células MA-10, y muy bajos niveles de esta enzima en CLI. Interesantemente y en concordancia con los resultados que aquí se presentan, se ha reportado sobreexpresión de HDC en numerosos modelos tumorales.

ABSTRACT

The Leydig cell tumor (LCT) is the most frequent testicular germ tumor. It often produces androgens, but can also secrete estradiol, causing gynecomastia. Patients with LCT also present erectile dysfunction, decreased libido, oligozoospermia, female distribution of pubic hair and / or testicular atrophy. Typical treatment of LCT is radical removal of the testis, epididymis and spermatic cord, complemented with chemotherapy or radiotherapy according to the stage of the tumor. This has serious physical and psychological conse-

quences, eventually compromising the patient's fertility. Importantly, 10% of the LCT has malignant evolution. Patients with metastatic LCT do not normally survive more than two years because they do not respond well to chemotherapy or radiotherapy. New therapeutic alternatives are therefore needed to improve the quality of life and survival of patients with TCL, as well as to preserve their fertility. In this regard, recent research has aimed to identify factors that can be used as a tool to interfere with tumor growth or malignancy. Histamine (HA) plays an important role in regulating cell proliferation and malignant transformation in several human tumors, and in experimental tumors induced in rodents. However, the involvement of HA in the biology of the TCL has not yet been explored. The overall objective of the present research project was to investigate the effect of HA on the proliferation of normal *versus* tumor Leydig cells, and the mechanisms of action involved. Collectively, our results demonstrate for the first time a proliferative effect of HA on MA-10 Leydig tumor cells mediated via activation of HRH2, transient elevation in cAMP production and increased ERK 1/2 phosphorylation levels. Also, our present findings constitute the first description of differential effects of HA on tumorigenic *versus* normal Leydig cells in the regulation of cell proliferation, and reveal a strikingly higher HDC expression level in the former.

BIBLIOGRAFÍA

1. Basciani S, Brama M, Mariani S, De Luca G, Arizzi M, Vesci L, Pisano C, Dolci S, Spera G, Gnessi L. Imatinib mesylate inhibits Leydig cell tumor growth: evidence for in vitro and in vivo activity. *Cancer Res* 2005; 65: 1897-1903.
2. Weiss JR, Moysich KB, Swede H. Epidemiology of male breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 20-26.
3. Soria JC, Durdax C, Chretien Y, Sibony M, Damotte D, Housset M. Malignant Leydig cell tumor of the testis associated with Klinefelter's syndrome. *Anticancer Res* 1999; 19: 4491-4494.
4. Kim I, Young RH, Scully RE. Leydig cell tumors of the testis. A clinico-pathological analysis of 40 cases and review of the literature. *Am J Surg Pathol* 1985; 9: 177-192.
5. Markou A, Vale J, Vadgama B, Walker M, Franks S. Testicular leydig cell tumor presenting as primary infertility. *Hormones (Athens)* 2002; 1: 251-254.
6. Egresos de establecimientos oficiales, por tumor maligno del testículo,

- por grupo de edad. Republica argentina. In: Dirección de Estadísticas e Información en Salud del Ministerio de Salud de La Nación.; 2006.
7. Defunciones por tumor maligno del testículo, por grupo de edad. República Argentina. In: Dirección de Estadísticas e Información en Salud del Ministerio de Salud de La Nación; 2007.
 8. Nurmio M, Toppari J, Zaman F, Andersson AM, Paranko J, Söder O, Jahnukainen K. Inhibition of tyrosine kinases PDGFR and C-Kit by imatinib mesylate interferes with postnatal testicular development in the rat. *Int J Androl.* 2007; 30(4): 366-76.
 9. [Siriani R](#), [Chimento A](#), [De Luca A](#), [Zolea F](#), [Carpino A](#), [Rago V](#), [Maggiolini M](#), [Andò S](#), [Pezzi V](#). Inhibition of cyclooxygenase-2 down-regulates aromatase activity and decreases proliferation of Leydig tumor cells. *J Biol Chem* 2009; 284(42):28905-28916.
 10. Falus A, Darvas S, Grossman N (eds.). *Histamine: Biology and Medical Aspects*. Budapest: SpringMed Publishing Ltd.; 2004.
 11. Darvas S, Falus A. Histidine decarboxylase (HDC) enzyme and gene. In: Falus A, Darvas S, Grossman N (eds.), *Histamine: Biology and Medical Aspects*. Budapest: SpringMed. Publishing Ltd.; 2004: 31-42.
 12. Lázár-Molnár E. Signal-transduction pathways of histamine receptors. In: Falus A, Darvas S, Grossman N (eds.), *Histamine: Biology and Medical Aspects*. Budapest: SpringMed. Publishing Ltd.; 2004: 90-96.
 13. Pós Z, Hegyesi H, Rivera E. Histamine and cell proliferation. In: Falus A, Darvas S, Grossman N (eds.), *Histamine: Biology and Medical Aspects*. Budapest: SpringMed. Publishing Ltd.; 2004: 199-217.
 14. Ramos-Jiménez J, Garduño-Torres B, Arias-Montaña JA. Histamina y comunicación intercelular: 99 años de historia. *Rev Biomed* 2009; 20: 100-126.
 15. Bolton E, King J, Morris DL. H2-antagonists in the treatment of colon and breast cancer. *Semin Cancer Biol* 2000; 10:3-10.
 16. Hernandez-Angeles A, Soria-Jasso LE, Ortega A, Arias-Montano JA. Histamine H1 receptor activation stimulates mitogenesis in human astrocytoma U373 MG cells. *J Neurooncol* 2001; 55:81-9.
 17. Hegyesi H, Somlai B, Varga VL, Toth G, Kovacs P, Molnar EL, *et al*. Suppression of melanoma cell proliferation by histidine decarboxylase specific antisense oligonucleotides. *J Invest Dermatol* 2001; 117:151-3.
 18. Lefranc F, Yeaton P, Brotchi J, Kiss R. Cimetidine, an unexpected anti-tumor agent, and its potential for the treatment of glioblastoma. *Int J Oncol* 2006; 28:1021-30.

19. Blaya B, Nicolau-Galmés F, Jangi SM, Ortega-Martínez I, Alonso-Tejerina E, Burgos-Bretones J, Pérez-Yarza G, Asumendi A, Boyano MD. Histamine and histamine receptor antagonists in cancer biology. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2010; 9(3): 146-57.
20. Mondillo C, Patrignani Z, Reche C, Rivera E, Pignataro O. Dual role of histamine in modulation of Leydig cell steroidogenesis via HRH1 and HRH2 receptor subtypes. *Biol Reprod* 2005; 73: 899-907.
21. Mondillo C, Pagotto RM, Piotrkowski B, Reche CG, Patrignani ZJ, Cymeryng CB, Pignataro OP. Involvement of Nitric Oxide Synthase in the Mechanism of Histamine-Induced Inhibition of Leydig Cell Steroidogenesis via HRH1 Receptor Subtypes in Sprague-Dawley Rats. *Biol Reprod* 2008.

REGENERACIÓN DE CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS UTILIZANDO OLIGONUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS QUE ESTIMULAN LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES ADULTAS

Dr. Alejandro Montaner¹, Dra. Victoria Lux-Lantos², Dra. Silvia Bianchi²,
Lic. Andrés Hernando Insúa¹

¹Fundación Pablo Cassará / Instituto de Ciencia y Tecnología Dr. César Milstein
(CONICET); ²Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME-CONICET)

OBJETIVOS:

Objetivo General:

- Diseñar y desarrollar fármacos derivados de los ODNs sintéticos que permitan curar la Diabetes

Objetivos Específicos:

- Estudiar el mecanismo de acción de los ODN PyNTTTTGT en modelos experimentales
- Estudiar las dosis efectivas y la toxicidad de los ODNs PyNTTTTGT en dichos modelos
- Desarrollar métodos de cultivos de células pancreáticas para identificar otros ODNs activos

Otros objetivos:

- Fortalecer los vínculos entre las Instituciones participantes y formar recursos humanos

INTRODUCCIÓN

Los oligonucleótidos (ODNs) inmunoestimulantes son moléculas sintéticas de ADN de cadena simple de aprox. 20 nucleótidos que pueden activar células específicas del sistema inmune, como linfocitos B (LB) y células dendríticas plasmacitoides (pDC). En la actualidad se conocen dos tipos de ODNs con estas características: los ODNs CpG (que contienen el dinucleótido Citosina-Guanina en su sitio activo) y los ODNs con motivo PyNTTTT-

GT (en donde Py representa Citocina o Timidita, T: Timidina, G: Guanina y N: cualquier nucleótido) (1,2). Los ODNs PyNTTTTGT han sido descriptos recientemente por nuestro grupo de trabajo (1) y, a diferencia de los ODNs CpG, tienen además la capacidad de estimular la proliferación de precursores de células madre (CM) mesenquimales (CMMs) adultas de médula ósea (MO) (3).

Las CM son células indiferenciadas que tienen la capacidad dar origen a distintas líneas celulares. Existen dos tipos de CM: las CM embrionarias (CME) y las CM adultas (CMA). El desarrollo de técnicas sofisticadas para aislar las CME ha traído la esperanza de poder contar con una fuente universal de tejidos para el del tratamiento de distintas enfermedades. Estas células son totipotenciales y, utilizando metodologías *in vitro*, pueden ser dirigidas a diferenciarse en distintos tipos celulares. Sin embargo existen objeciones de tipo ético y médico sobre su uso. Las cuestiones éticas están principalmente relacionadas al hecho de que normalmente la obtención de estas células solo se logra a partir de embriones tempranos. Las cuestiones médicas, están relacionadas a la posibilidad de introducir enfermedades o desórdenes genéticos con las células transformadas.

En el organismo adulto también es posible encontrar CM localizadas en MO y en distintos órganos. A diferencia de las CME, en general las CMA dan origen a las células del órgano en el cual residen. Sin embargo su número es muy escaso y se necesitan técnicas de amplificación *ex vivo* para poder ser re-implantadas en un paciente.

Resultados recientes de nuestro equipo han demostrado que los ODNs PyNTTTTGT son efectivos en distintos modelos animales de lesión de hueso (3,4) y, nervios periféricos (5). Al ser inoculados por vía sistémica, estos ODNs aceleran el proceso de regeneración y/o disminuyen los síntomas asociados a la injuria, respecto de sus respectivos controles. Luego, estudiamos el efecto del prototipo de los ODNs PyNTTTTGT, denominado IMT504, en un modelo de lesión pancreática en rata. Los resultados preliminares mostraron un efecto reparador de dicho ODN. Los animales tratados re-establecieron su glucemia a nivel normal y recuperaron la funcionalidad de los islotes dañados.

En este Proyecto se propuso estudiar el efecto del ODN IM504 sobre la regeneración de las células beta a fin de determinar si su acción era directa o indirecta.

MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS DESARROLLADOS:

Se estudiaron dos modelos de lesión: en ratas Sprague Dawley y en ratones Balb-C:

En ratas, se indujo la lesión pancreática por inyección de una dosis única de STZ de 60 mg/kg. Se monitoreó la glucemia diariamente, y una vez confirmada la hiperglucemia (días 3/4 post-inyección), se inició el tratamiento con 20 mg/kg/dosis del ODN IMT504 por vía subcutánea durante 10 días consecutivos. Una vez finalizado el tratamiento, se realizaron estudios de funcionalidad pancreática (test de tolerancia i.p. a la glucosa IPGTT, HOMA-IR, HOMA-beta). Luego se sacrificaron los animales, se disecaron los órganos, se realizaron cortes seriados de páncreas y se estudiaron los siguientes marcadores por inmunohistoquímica (IHQ): Insulina, Glucagon (funcionalidad de los islotes); Nuerogenina-3, Nestina (precursores de linaje pancreático); CD73, CD105, CD90 (marcadores de CMMs); CD34, CD45 (reclutamiento y hematopoyesis); PCNA (proliferación celular); CD3 CD68 (infiltración linfocitaria); Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) y TNF stimulated gene/protein 6 (TSG-6) (inmuno-moduladores).

En ratones, se indujo la lesión por inyección de múltiples dosis bajas de STZ (40 mg/kg) a fin de imitar la fisiopatología de la Diabetes tipo I (DT1) en humanos. Nuevamente, se inició el tratamiento con 20 mg/kg/dosis del ODN IMT504 por vía s.c. Se ensayaron distintos esquemas de inoculación. Una vez finalizado los tratamientos, se estudió la funcionalidad pancreática. Luego se sacrificaron los animales, se realizaron cortes seriados de páncreas y se determinó el contenido de Insulina y Glucagon por IHQ. Además, se analizó el índice de infiltración de los islotes y el perfil de citoquinas, a fin de evaluar la participación del sistema inmune en el proceso de regeneración pancreática.

Para ambos modelos experimentales, se calcularon los parámetros morfo-métricos utilizando un software para el análisis de imágenes (Image Pro-Plus).

RESULTADOS OBTENIDOS

Efecto del ODN IMT504 sobre la glucemia en ratas diabéticas:

La Fig. 1 (a-c) muestra el efecto favorable del IMT504 en términos de glucemia y tests de funcionalidad pancreática (IPGTTs, HOMAs).

A los 30 días de iniciado el tratamiento, se sacrificaron los animales y se realizaron cortes seriados de páncreas para estudiar la expresión de Insulina y Glucagon. Se realizaron marcaciones dobles por IHQ (Fig. 1 d-g) y se deter-

minaron los índices morfométricos (Fig. 1 h-j). Los animales tratados con IMT504 mostraron una franca recuperación, con mayor número de islotes y mas células beta por islote, respecto de las ratas diabéticas sin tratar.

Por otro lado, y con el fin de estudiar los mecanismos de acción involucrados tempranamente en la recuperación de la glucemia observados en la Fig. 1; se tomó un nuevo grupo de animales, se indujo la Diabetes y se inició el tratamiento con IMT504. A los 4 días de iniciado el tratamiento (cuando la glucemia bajo a niveles normales), se sacrificaron los animales y se realizaron cortes seriados de páncreas para estudiar proliferación celular por incorporación de PNCA nuclear (Fig. 2 a-e) y expresión de precursores de origen pancreático como Nestina (Fig. 2. f-j) y Neurogenina-3 (Fig. 2 k-o). En los animales tratados con IMT504 se observó aumento en la expresión de estos dos marcadores respecto de los respectivos controles.

Figura 1. Efecto del IMT504 en ratas diabéticas

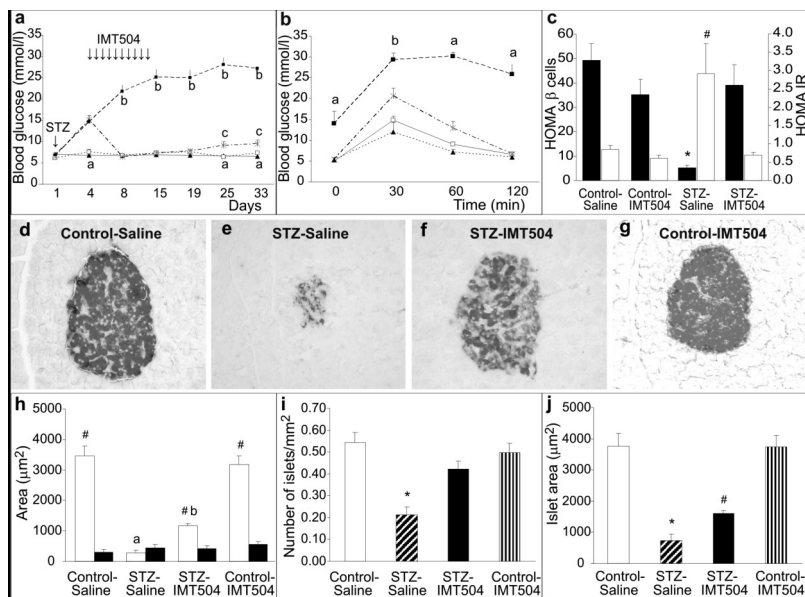


Fig. 1: (a) Efecto de IMT504 sobre la glucemia basal, Control-Saline (triángulo negro), STZ-Saline (cuadrado negro), STZ-IMT504, (asterisco) y Control-IMT504 (cuadrado blanco). Flecha indica tratamiento con IMT504. (b) Efecto de IMT504 sobre IPGTTs. (c) Efecto de IMT504 sobre HOMA-beta (negro) y HOMA-IR (blanco) (d, e, f, g) Imágenes de islotes pancreáticos de cada grupo. (h) Area, (i) Numero de islotes y (j) Area de islotes Insulino-positivo (blanco) y glucagon-positivo (negro). *Diabetologia*. 2010, 53(6):1190-1198.

Figura 2: Expresión de marcadores a los 4 días de tratamiento con IMT504

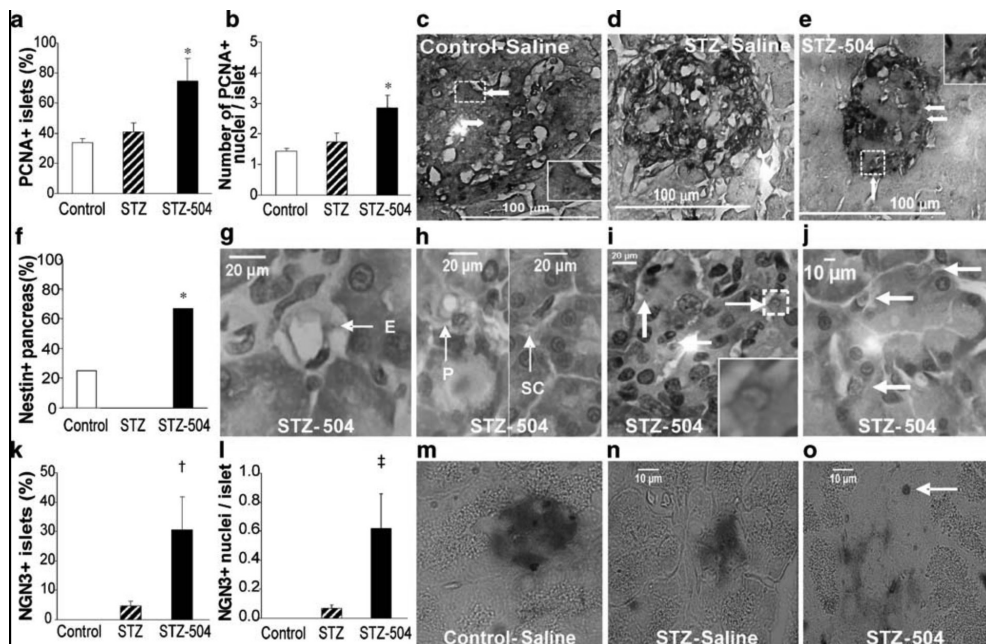


Fig. 2: IMT504 induce PCNA (a–e), Nestina (f–j) y Ngn3 (k–o) en ratas diabéticas tratadas con IMT504 (STZ-IMT504). (a–e) Marcación triple para insulina (rojo), glucagon (marrón) y PCNA (azul). (a) Porcentaje de islotes PCNA-positivos en Control-Saline (n = 126), STZ-Saline (n=58) y STZ-IMT504 (n=51). (b) Número de núcleos PCNA-positivos por islote. (c) Control-Saline; (d) STZ-Saline. (e) STZ-IMT504; las flechas muestran núcleos PCNA-positivos; (f–j) Marcación doble para insulina (rojo) y nestina (marrón). (f) Porcentaje de pancreas Nestin-positivos. (g) Nestina-positiva en endotelio de rata STZIMT504. (h) Izq., pericito nestina-positivo rodeando una arteriola; Der., célula estrellada nestina-positiva en parénquima pancreático de rata STZ-IMT504. (i) Páncreas STZ-IMT504; las flechas muestran microvasculatura nestina-positiva, línea punteada: microvasculatura, (j) Células nestina-positivas en acinos exocrinos de ratas STZ-IMT504. (k–o) Marcación doble para insulina (rojo) y Ngn3 (azul). (k) Porcentaje de islotes NGn3-positivos en ratas Control-Saline (n=115), STZ-Saline (n=68) y STZ-IMT504 (n=67). (l) Numero de núcleos Ngn3-positivos por islote. (m)en ratas Control-Saline, (n) STZ-Saline y (o) STZ-IMT504. Diabetologia. 2010, 53(6):1190-1198.

Paralelamente se evaluó la infiltración celular y la expresión de CD3 y CD68 (Fig. 3) y de dos moléculas con probada actividad inmunosupresora (IDO y TSG-6) (Fig. 4). Los animales tratados con IMT504 mostraron una

franca recuperación, con mayor número de islotes y mas células beta por islote (Fig. 3). Por otro lado, no se observó infiltración linfocitaria ni presencia de macrófagos. Mas aún, no se observaron diferencias significativas en la expresión de IDO y TSG-6 (Fig. 4) y los marcadores de CMMs, reclutamiento y hematopoyesis (datos no mostrados).

Figura 3: Infiltración leucocitaria en islotes pancreáticos

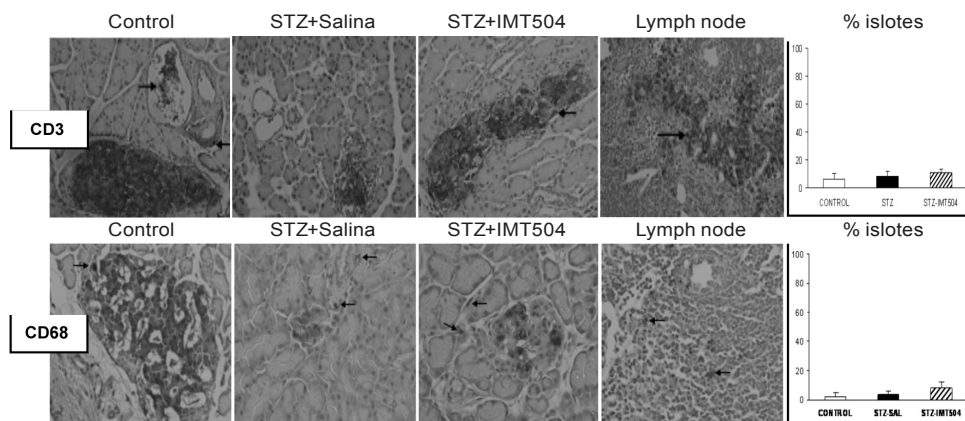


Fig. 3: Infiltración de linfocitos T (CD3) y macrófagos (CD68) en cortes histológicos de páncreas de ratas. Se muestra una marcación doble por IHQ. En rojo: células beta del islote pancreático que expresan insulina. En marrón: células CD3 o CD68 positivas. El corte de nódulo linfático se tomo como control positivo. Ratas normales (Control), diabéticas sin tratar (STZ+Salina) o diabéticas tratadas con IMT504 (STZ+IMT504). Las flechas muestran células CD3 o CD68 positivas. El grafico de barras resume en análisis morfométrico expresado en porcentaje de islotes con marca positiva (n: 5 animales por grupo). ANOVA: ns.

Figura 4: Expresión de marcadores inmunológicos en islotes pancreáticos

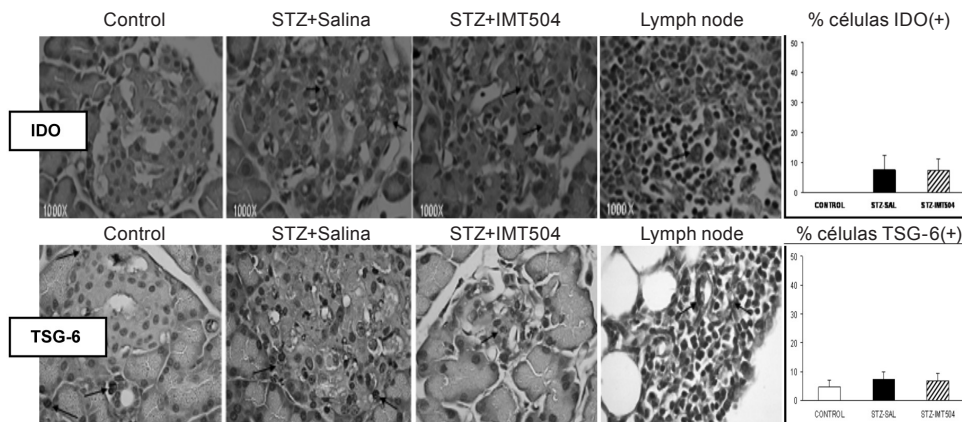


Fig. 4: Expresión de IDO y TSG-6 en cortes histológicos de páncreas analizados por inmunohistoquímica. Las flechas muestran células positivas en marrón. El corte de nódulo linfático se tomó como control positivo. Se muestra una imagen representativa de cada grupo: Ratas normales (Control), diabéticas sin tratar (STZ+Salina) o diabéticas tratadas con IMT504 (STZ+IMT504). El gráfico de barras resume en análisis morfométrico expresado en porcentaje de células con marca positiva (n: 5 animales por grupo). ANOVA: ns.

En función de estos resultados, se propone que el mecanismo de acción del ODN IMT504 estaría asociado a la estimulación de precursores locales, sin la participación la participación del Sistema Inmune.

Efecto del ODN IMT504 sobre la glucemia en un modelo de Diabetes tipo I en ratones:

En los ensayos anteriores se mostró el efecto favorable del IMT504 sobre la recuperación de la glucemia y la funcionalidad pancreática en ratas. A continuación se estudió el efecto del ODN en un modelo experimental de ratón. A diferencia de lo que sucede en ratas, este modelo imita con gran precisión la fisiopatología de la DTI en humanos, que cursa con una franca infiltración leucocitaria en los islotes. Los animales diabéticos se inyectaron diariamente por vía s.c. con una dosis de IMT504, durante 20 días. Se ensayaron 3 dosis de IMT504: 2, 10 y 20 mg/kg (Fig. 5). Tres semanas después de finalizado el

tratamiento, se determinó la funcionalidad pancreática en todos los grupos (Fig. 6). Luego se estudió la expresión de Ins y Glucagon por IHQ (Fig. 7) y se evaluó la infiltración celular (Fig. 8).

Al momento del sacrificio, los animales diabéticos sin tratar fueron francamente hiperglucémicos (410 ± 56 mg/dl) respecto de los controles normales (137 ± 4 mg/dl). Por otro lado, se observó una respuesta diferencial los animales diabéticos tratados con IMT504 en función de las dosis utilizadas: IMT504 2 mg/kg: 47% de los ratones normalizaron sus glucemias (3/7); IMT504 10 mg/kg: 67% de respuesta (4/6); IMT504 20 mg/kg: 86% de respuesta (6/7) (Fig. 5). A continuación se realizaron los test de tolerancia a la glucosa con el grupo tratado con 20 mg/kg/dosis (Fig. 6). Se observa una recuperación parcial de la función pancreática de los animales tratados.

Fig. 5: Efecto de IMT504 sobre la glucemia Fig. 6: Test de tolerancia a la glucosa

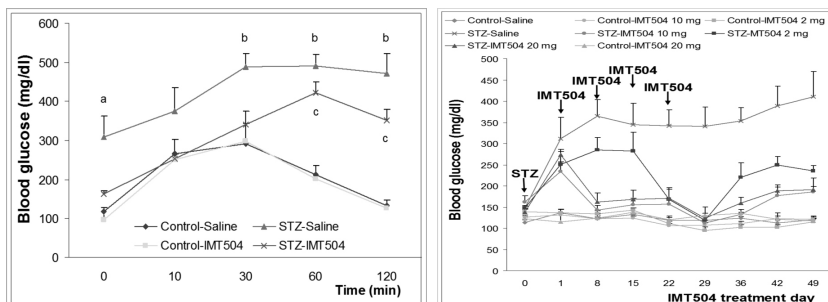


Fig. 5: Curvas de Dosis-Respuesta en ratones Blab-C diabéticos tratados con distintas dosis de IMT504 s.c (n: 7 animales por grupo). Las flechas muestran los días de tratamiento.

Fig. 6: Efecto de IMT504 sobre la funcionalidad pancreática en animales diabéticos tratados con IMT504 (20 mg/kg/dosis). ANOVA en dos sent ($p < 0.01$); a: STZ-Salina distinto de todos. b: STZ-Salina distinto de Ctrl.; c: STZ-IMT504 distinto de Ctrl.

Figura 7: Efecto de IMT504 sobre la expresión de Insulina y Glucagon

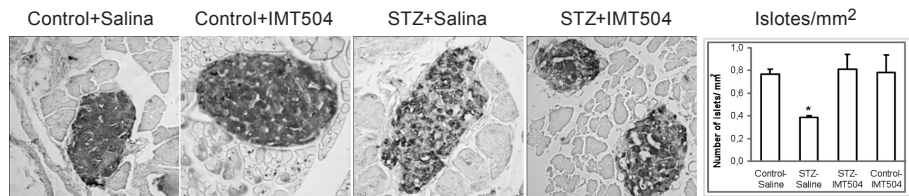


Fig. 7: Expresión de Insulina (rojo) y Glucagon (marrón) en cortes histológicos de páncreas analizados por IHQ. Se muestra una imagen representativa de cada grupo: Ratones normales (Control) tratados con Salina o IMT504, diabéticos sin tratar (STZ+Salina) o diabéticos tratados con IMT504 (STZ+IMT504). El grafico de barras resume en análisis morfométrico expresado en número de islotes por mm² de tejido (n: 5 animales por grupo). ANOVA en un sentido, $p < 0.05$ *: diferente de todos.

Los animales tratados con IMT504 mostraron una franca recuperación, con mayor número de islotes y mas células beta por islote, respecto de las ratones diabéticas sin tratar (Fig. 7).

Figura 8: Infiltración leucocitaria en islotes pancreáticos

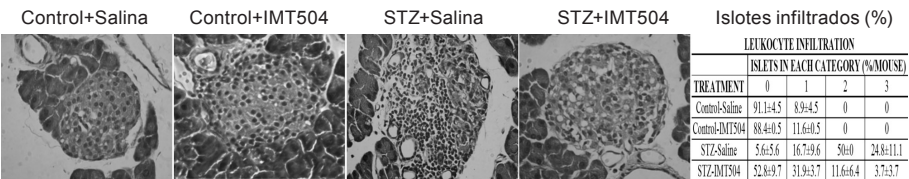


Fig. 8: Infiltración de linfocitos T en cortes histológicos de páncreas de ratones (n: 5 animales por grupo). Se muestra una imagen representativa de cada grupo: Ratones normales (Control) tratados con Solución Salina o IMT504, diabéticos sin tratar (STZ+Salina) o diabéticos tratados con IMT504 (STZ+IMT504). La Tabla muestra el porcentaje de islotes con distinto grado de infiltración, según el siguiente criterio: GRADO 0 (no insulinitis): ausencia de infiltración celular. GRADO 1 (peri insulinitis): infiltración de leucocitos restringida a la periferia de los islotes. GRADO 2 (insulinitis moderada): < 50% del área del islote está infiltrada. GRADO 3 (insulinitis severa): ≥ 50% del área del islote está infiltrada.

Los animales tratados con el ODN mostraron una regresión en el grado de infiltración linfocitaria en los islotes (Fig. 8), lo que podría estar asociado con un menor daño tisular.

Del análisis integral de los resultados surge que los animales con Diabetes tipo I respondieron al tratamiento con el ODN IMT504. Esto se pone de manifiesto en los siguientes parámetros:

- la hiperglucemia inducida por STZ se revierte significativamente,
- la mejoría en la glucemia persiste al menos 25 días después de la última dosis,
- la funcionalidad de las células beta se recupera, aunque no se normaliza totalmente,
- la infiltración leucocitaria dentro y alrededor de los islotes se reduce sustancialmente,
- la morfología del islote mejora enormemente,
- el número de islotes por área pancreática aumenta significativamente.

CONCLUSIONES

Esta tecnología representa un gran avance desde el punto de vista terapéutico, ya que el ODN IMT504 podría estimular los precursores pancreáticos residentes en los tejidos maduros, evitando las técnicas de amplificación *ex vivo* que se utilizan actualmente en las terapias regenerativas.

REFERENCIAS

1. Elias F, Flo J, Rodriguez J, De Nichilo A, Lopez RA, Zorzopulos J, Nagle C, Lahoz M and Montaner A. **PyNTTTTGT prototype oligonucleotide IMT504 is a potent adjuvant for the recombinant Hepatitis B vaccine that enhances the Th1 response.** *Vaccine* 23(27): 3597-3603 (2005).
2. Rodriguez JM, Elias F, Fló J, Lopez RA, Zorzopulos J and Montaner AD. **Immunostimulatory PyNTTTTGT non-CpG oligonucleotides: structural properties and refinement of the active motif.** *Oligonucleotide*, 16:275-285 (2006).
3. Hernando IA, Montaner AD, Rodriguez JM, Elias F, Flo J, Lopez RA, Zorzopulos J, Hofer EL, Chasseing NA. **IMT504, the Prototype of the**

Immunostimulatory Oligonucleotides of the PyNTTTTGT Class, Increases the Number of Progenitors of Mesenchymal Stem Cells Both In Vitro and In Vivo: Potential Use in Tissue Repair Therapy. *Stem Cells* 25;1047-1054 (2007).

4. Insúa AH, Montaner AD, Rodríguez JM, Elías F, Fló J, López RA, Zorzopulos J. **PyNTTTTGT Oligonucleotides as Tools in Tissue Repair Procedures.** *Topics in Tissue Engineering*. Vol. 3, Eds. N Ashammakhi, R Reis & E Chiellini © (2007).
5. Coronel MF, Hernando-Insua A, Rodríguez JM, Elías F, Chasseing NA, Montaner AD, Villar MJ **Oligonucleotide IMT504 reduces neuropathic pain after peripheral nerve injury.** *Neurosciences Letters* 444:69-73 (2008).

Los resultados obtenidos fueron publicados en:

- Bianchi MS, Calvo V, Chasseing NA, Lago N, Libertun C, Montaner AD, Lux-Lantos VA. **Oligodeoxynucleotide IMT504: lack of effect on immune parameters during islet regeneration in single dose streptozotocin-induced diabetes.** *Diabetes Metab Res Rev*. 2012; 28(2):156-63.
- Bianchi MS, Hernando-Insúa A, Chasseing NA, Rodríguez JM, Elías F, Lago N, Zorzopulos J, Libertun C, Montaner AD, Lux-Lantos VA. **ODN IMT504 induces a marked recovery in a STZ-induced model of diabetes in rats: correlation with an early increase in the expression of nestin and neurogenin 3 progenitor cell markers.** *Diabetologia*. 2010; 53(6):1184-9.
- Lux-Lantos V, Bianchi S, Chasseing A, Montaner A. **Do immunomodulatory proteins participate in IMT504-induced islet regeneration?** European Molecular Biology Organization (EMBO) Workshop: "Disease, Development and Stem Cells in the Pancreas" 14/16 June (2010). Stockholm, Sweden.

RESUMEN:

Los oligonucleótidos (ODNs) inmunomoduladores son moléculas sintéticas de ADN de cadena simple que pueden activar células específicas del sistema inmune. En la actualidad se conocen dos tipos según su sitio activo: los ODNs- CpG y los ODNs-PyNTTTTGT. A diferencia de los ODNs-CpG,

además de estimular linfocitos B y células dendríticas plasmacitoides, los PyNTTTGTs favorecen la proliferación de células madre mesenquimales adultas de médula ósea.

Nuestro equipo demostró que al ser inoculados por vía subcutánea, estos ODNs aceleran el proceso de regeneración en distintos modelos experimentales de daño de tejidos. En este trabajo se estudió el efecto de un ODN-PyNTTTGT, denominado IM504, en un modelo de lesión pancreática en rata y en un modelo de Diabetes tipo I en ratón.

Una vez establecido el daño y confirmada la hiperglucemia, se inició el tratamiento con distintas dosis del IM504 (2-20 mg/kg) durante 10-20 días consecutivos. Luego, se realizaron estudios de funcionalidad pancreática, se sacrificaron los animales y se estudiaron distintos marcadores celulares por inmunohistoquímica (IHQ).

En ambos modelos experimentales, los animales tratados con IM504 mostraron una franca recuperación: re-establecieron su glucemia a nivel normal, mostraron mayor número de islotes, mas células beta por islote y recuperaron la funcionalidad pancreática.

Los estudios de IHQ en páncreas de ratas tratadas con IM504, revelaron mayor proliferación celular (PNCA) y expresión de precursores de origen pancreático (Nestina y Neurogenina-3). Por otro lado, no se observó variación en la expresión de linfocitos T y macrófagos (CD3 y CD68), ni de moléculas inmunosupresoras (IDO y TSG-6). Se propone que el efecto del IM504 en este modelo estaría asociado a la estimulación de precursores locales, sin la participación la participación del sistema inmune.

A diferencia de la rata, el modelo de DT1 en ratones esta dada por la infiltración leucocitaria de los islotes pancreáticos. En este sentido, cabe destacar que los animales tratados con IM504, mostraron una regresión en el grado de infiltración linfocitaria, lo que podría estar asociado con un menor daño tisular. Los estudios de marcadores de linaje pancreático y mesenquimal están actualmente en desarrollo. Sin embargo, se postula que en ratones, la recuperación del daño pancreático podría estar asociado a una regulación de la respuesta auto-inmune por el IM504

La tecnología presenta un gran avance desde el punto de vista terapéutico ya que al ser inoculada por vía sistémica, esta molécula podría estimular los precursores pancreáticos residentes en el tejido maduro y/o disminuir el grado de infiltración en los islotes.

ABSTRACT

Synthetic immunomodulatory oligonucleotides (ODNs) are single-stranded DNA molecules that can activate specific cells of the immune system. Two types of ODNs are described so far: CpG-ODNs and PyNTTTTGT-ODNs. Unlike the CpG-ODNs, as well as stimulate B cells and dendritic cells plasmacitoides, the PyNTTTGTs stimulate the proliferation of adult bone marrow mesenchymal stem cells.

We showed that these ODNs accelerate the regeneration process in different experimental models of tissue damage when inoculated subcutaneously. In this work we studied the effect of a PyNTTTTGT-ODN, called IM504, in a model of pancreatic injury in rat and a model of type I Diabetes in mouse.

Once established the damage and confirmed the hyperglycemia, animals were treated with different doses of the IM504 (2-20 mg/kg) for 10-20 consecutive days. Then, pancreatic function studies were carried out; animals were sacrificed and different cell markers studied by immunohistochemistry (IHQ).

In both experimental models, animals treated with IM504 showed a frank recovery: they re-established their blood glucose levels, showed more islets, more beta cells by islet and recovered the pancreatic functionality.

The IHQ studies in pancreas of rats treated with IM504, revealed higher cell proliferation (PNCA) and expression of precursors of pancreatic origin (Nestin and Neurogenine-3). On the other hand, there was no variation in the expression of T cells and macrophages (CD3 and CD68), or of immunosuppressive molecules (IDO and TSG-6). It is proposed that, at least in this model, the effect of IM504 would be associated with stimulation of local precursor and lack of participation of the immune system.

Unlike the rat model, DT1 in mice is due to pancreatic islet lymphocyte infiltration. In this regard, it is of note that animals treated with IM504, showed a regression in the degree of lymphocyte infiltration, which could be associated with less tissue damage. Studies of pancreatic lineage and mesenchymal markers are currently in progress. The participation of the immune regulation in this model of auto-immune disease should be carefully taken into consideration.

This technology might represent a breakthrough from the therapeutic standpoint. By inoculated systemically, this molecule could stimulate the resident pancreatic precursors in mature tissue and/or reduce the degree of infiltration in the islets.



UN NUEVO ROL DEL SISTEMA ANGIOTENSINÉRGICO: SU PARTICIPACIÓN EN LA INVOLUCIÓN MAMARIA POSTLACTANCIA.

Karen A Nahmod

Laboratorio de Inmunología, IIHEMA, Academia Nacional de Medicina Buenos Aires

INTRODUCCIÓN

Además de su conocida acción en la homeostasis del sistema cardiovascular y renal, la AngII ejerce múltiples funciones actuando en forma autócrina o parácrina afectando el crecimiento, la diferenciación y apoptosis celulares, por lo que es considerada una verdadera citoquina. Numerosa evidencia apoya la existencia de RAS tisulares en los cuales AngII es producida localmente ejerciendo diversos efectos fisiológicos y/o patológicos (1-4). AngII actúa a través de dos receptores acoplados a proteína G, el AT1 y el AT2, lo cuales poseen características farmacológicas distintivas y activan diferentes vías de señalización (5).

La glándula mamaria (GM) atraviesa repetidos ciclos de crecimiento, diferenciación y regresión. En la preñez, se desarrollan las estructuras lóbulo-alveolares secretorias que ocupan completamente el estroma tisular; dichas estructuras persisten hasta el final de la lactancia. Durante la lactancia predomina la diferenciación terminal con la producción de leche. En este período la supervivencia de las células alveolares es estimulada por la succión y a nivel molecular, por la activación de cascadas transduccionales que incluyen los ejes PRL-STAT5 e IGF-1-PI3K-AKT (6). La involución mamaria post-lactancia (IM) que se produce al final de este período, se divide en 2 fases. Durante la fase temprana, que comprende las primeras 48hs post-destete, la estasis de leche induce factores locales como LIF y TNF α , que gatillan la apoptosis masiva del epitelio alveolar e involucra la activación de STAT3 y el clivaje de caspasa 3 (7-9). La fase tardía se caracteriza por intenso remodelado tisular con un patrón de expresión temporal y espacial de matriz-metaloproteasas (MMP) bien definido que rompen la matriz extracelular que sostiene los alvéolos conduciendo a su colapso (10). Asimismo, otras vías pro-apoptóticas de señalización han sido implicadas en la IM, incluyen-

do miembros de la familia de receptores de muerte (Death Receptor ligand family) como (NF)- κ B/I κ B kinase (IKK), TWEAK, TNF- α or Fas/Fas-L y miembros de la familia de Bcl-2. La delección del gen del factor anti-apoptótico BCL-X^L acelera la apoptosis mientras que la pérdida de la proteína pro-apoptótica Bax retrasa la IM (11,12). La expresión de una forma constitutivamente activa de AKT gatilla señales de sobrevivencia aun durante la IM sugiriendo que pAKT sería un regulador importante del epitelio mamario (13).

Recientemente se ha demostrado que los componentes del RAS son expresados por células epiteliales ductales tanto de glándulas normales como tumorales (14,15). También se ha reportado que el RAS jugaría un rol crítico en las distintas fases de progresión tumoral en la GM (16,17). Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito un rol del RAS en la GM normal. Considerando que AngII activa en diferentes tipos celulares, vías de señalización que son críticas durante la IM (18-20), decidimos explorar la contribución del RAS en dicho proceso.

MATERIALES Y METODOS

Cultivo celular. Células HC11, derivadas de GM normal de ratones Balb/c fueron cultivadas como fuera descrito previamente (21). Al alcanzar 90% de confluencia fueron mantenidas en medio sin suero durante 4hs antes de ser estimuladas con AngII (10^{-6} M) o vehículo.

Animales y diseño experimental. Ratones deficientes en los receptores AT1A o AT1B fueron generados como fuera descrito previamente (22). Luego del parto se normalizó el número de crías en 4-6 por hembra lactante. Las crías fueron removidas al 8vo día del período de lactancia para inducir el proceso de IM. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y el 4to par de GM (inguinales) removidas a las 24, 48, 72, 96 o 120 hs luego del destete para cortes histológicos, extracción proteica o purificación de RNA. Los ratones lactantes que recibieron tratamiento local fueron inyectados por vía subcutánea intramamaria con 100 μ l de AngII 10^{-6} M solubilizada en 0.9% NaCl o con 0.9% NaCl (control), o irbesartan 10^{-5} M + AngII 10^{-6} M en un volumen final de 100 μ l utilizando el mismo solvente. En todos los casos AngII o el solvente fueron inyectados en la GM contralateral para excluir la posible activación de STAT3 por distensión alveolar secundaria a la inoculación de volumen. Los ratones que recibieron tratamiento sistémico con AngII, fueron inyectados por vía subcutánea en la región dorsal alta con 150 μ l de

AngII 10^{-5} M diluido en 0.9% NaCl. Los ratones que recibieron tratamiento con losartan fueron inoculados diariamente por vía subcutánea en la región dorsal alta con una dosis de 20mg/kg/día mientras el grupo control recibió NaCl 0.9% (23). La primera dosis fue administrada 1 día antes del retiro forzado de las crías.

Las siguientes técnicas fueron realizadas según fuera descripto previamente: *Histología, inmunohistoquímica, y TUNEL (9), Polymerase chain reaction (PCR) para genotipificación (24), RT-PCR convencional y cuantitativa (25), Inmunofluorescencia (26), Western blot analysis (9), Zymografía (10) y RNase protection assay (RPA) (26-27).*

Análisis estadístico. Student's *t* test o análisis de la varianza combinado con Tukey como post test.

RESULTADOS

Cascadas de señalización gatilladas por AngII en células epiteliales mamarias murinas *in vitro*.

Demostramos por qT-PCR y WB que las células epiteliales mamarias murinas normales HC11 expresan los receptores AT1 y AT2 y confirmamos dicha expresión mediante microscopía confocal. Luego testearon la capacidad de AngII de gatillar la activación de cascadas de señalización que se activan durante la IM. Observamos que AngII induce activación de ERK1/2 y STAT3, JNK, AKT y P65; mientras que no indujo cambios significativos en los niveles de fosforilación de P38 o I κ Ba.

La administración exógena de AngII en GM murinas durante la lactancia induce eventos asociados a involución.

STAT3 es el principal factor de transcripción descripto hasta el momento capaz de inducir apoptosis durante la IM. Durante la lactancia la tasa de apoptosis epitelial es muy baja y STAT3 se encuentra inactivo por lo que resulta una fase ideal para estudiar estímulos pro-apoptóticos en la GM (6-8). AngII fue administrada por vía sistémica o local en la GM de hembras en fase de lactancia. Mediante WB demostramos que AngII induce una fuerte activación de STAT3 así como también de ERK-1/2, efecto parcialmente bloqueado por irbesartan, sugiriendo dicha activación estaría mediada por el AT1. Mediante inmunohistoquímica demostramos que la inyección local de AngII induce la traslocación nuclear de STAT3. Las GM tratadas con AngII presen-

taron un porcentaje 3 veces mayor de núcleos apoptóticos en comparación con el control en el ensayo de tunel. El hecho que AngII induce activación de STAT3 así como también apoptosis en células epiteliales *in vivo*, nos llevaron a estudiar el rol del RAS en IM.

Expresión de los components del RAS durante la IM

Estudiamos el patrón de expresión de AT¹, AT², AGT y ECA durante el ciclo lactancia/involución en GM murinas mediante qRT-PCR. El transcripto del receptor AT¹ se incremento gradualmente a partir de las 24hs del destete manteniendo este patrón durante 3 días. La expresión del AT² se incremento significativamente a las 96hs mientras que el AGT mostró un pico a las 48hs y otro a las 96hs post-destete. La ECA en cambio presentó un pico precoz a sólo 6hs post-destete. Confirmamos además mediante RNase protection assays (RPA) que la expresión del receptor AT^{1A} se incrementa a las 72-96hs post-destete. Mediante inmunofluorescencia observamos que conforme avanza el proceso de IM, la GM presenta mayor expresión de AT¹, AT² y AGT tanto en células epiteliales como en adipocitos, corroborando los hallazgos obtenidos mediante qRT-PCR. El hecho que exista un patrón de expresión bien definido del RAS en la IM sugiere que la expresión de estas proteínas esta finamente regulada y que jugarían un rol significativo durante este proceso.

El bloqueo del receptor AT¹ retarda el proceso de IM post-lactancia

Con el fin de identificar el rol de la AngII endógena durante la IM realizamos ensayos *in vivo* administrando losartan, un antagonista del R-AT1. Hembras lactantes junto a sus crías fueron separadas en 2 grupos experimentales: un grupo recibió inyecciones subcutáneas de losartan (LOS), mientras que el segundo grupo recibió 0.9% NaCl (vehículo). 72hs y 96hs luego del destete el grupo LOS mostró menor colapso de estructuras alveolares, persistencia de cúmulos de células epiteliales y una mas lenta reaparición de adipocitos en comparación con el grupo control, diferencias que persistieron hasta las 120hs post-destete. Además, el grupo LOS presentó menor acumulo de células epiteliales morfológicamente apoptóticas en el lumen alveolar a las 48hs post-destete. El efecto anti-apoptótico del losartan sobre las células epiteliales fue evaluado mediante un ensayo de inmunohistoquímica contra caspasa-3 clivada y mediante TUNEL. El porcentaje de células apoptóticas encontrado en las GM del grupo LOS a 72hs de IM fue significativamente menor que en el grupo control. Estos resultados demuestran que el bloqueo del receptor AT¹ durante la IM resulta en inhibición de apoptosis epitelial y retraso en la IM.

El bloqueo del receptor AT¹ retarda el proceso de IM

Con el objetivo de identificar mecanismos moleculares subyacentes al retraso en la IM inducido por la disrupción en la señalización del AT¹, estudiamos factores de transcripción críticos asociados a apoptosis durante la IM. No observamos alteraciones significativas en los niveles de fosforilación de los factores pro-apoptóticos STAT3 o ERK1/2 en GM en ninguno de los tiempos analizados luego de recibir tratamiento con losartan. Sin embargo, BCL-x^L, un factor anti-apoptótico miembro de la familia Bcl-2, se encontró fuertemente expresado en GM a 24 y 48hs post-destete en el grupo LOS. Asimismo, encontramos un sustancial incremento en los niveles de fosforilación de AKT a 24 y 48h post-destete en el grupo LOS. Con el objetivo de estudiar si el bloqueo del AT¹ altera la expresión de genes de respuesta temprana durante la IM analizamos la expresión en GM de mRNA de LIF y TNF- α mediante qRT-PCR. El grupo LOS mostró una inhibición significativa de ambos factores producidos localmente. Así, el bloqueo del AT¹ durante la IM induce pAKT y BCL-x^L, resultando en inhibición de apoptosis epitelial y retraso en la IM.

Mediante el Tricrómico de Masson, una tinción que permite la visualización de fibras de colágeno y reticulina, analizamos los componentes del estroma mamario durante la IM. Las GM del grupo LOS presentaron menores depósitos de fibras de colágeno y reticulina alrededor de los alvéolos y ductos en comparación con el grupo control a 48, 72 y 96hs post-destete. El análisis zimográfico de MMP-2 y MMP-9 en GM del grupo LOS identificó una inhibición en la actividad de ambas metaloproteasas durante la fase tardía de IM (72, 96 y 120hs) y dicha inhibición es dosis dependiente.

Ratones deficientes en las isoformas AT^{1A} y/o AT^{1B} del receptor AT¹ presentan retardo en la IM

Los roedores poseen dos isoformas del R-AT¹: AT^{1A} y AT^{1B} producto de genes expresados y regulados en forma diferencial y farmacológicamente indistinguibles (5). Con el fin de dilucidar la relevancia del R-AT¹ en la IM estudiamos las GM de ratones deficientes en las isoformas AT^{1A} -, AT^{1B}- y AT^{1A} /AT^{1B} o DKO (doble knockouts). En concordancia con nuestros hallazgos previos utilizando bloqueantes farmacológicos del R-AT¹ como el losartan, observamos que las GM de ratones deficientes en ambas isoformas del AT¹ presentaban un dramático retardo en la IM. Tanto a las 72 como a las 96hs post-destete las GM de los ratones deficientes en AT^{1A} presentaron casi la totalidad de las estructuras lóbulo-alveolares distendidas con mínima invasión de tejido adiposo. Las GM de los ratones deficientes en AT^{1B} mostraron

similares aunque menos dramáticos cambios. Las GM de los ratones deficientes en ambas isoformas presentan menor depósito de colágeno periductal y perialveolar en comparación con los WT. Además, el retraso en la IM observado en los ratones deficientes en AT1 se correlacionó con un menor porcentaje de células epiteliales apoptóticas a 72hs post-destete. Estos resultados demuestran que la AngII actuando a través del R-AT1 cumple un rol crítico en la inducción de apoptosis y remodelado tisular en la IM.

CONCLUSIÓN

Mediante el bloqueo farmacológico del receptor AT¹ y ratones deficientes en dicho receptor, demostramos que la falta de señalización del R-AT1 induce factores de sobrevida como BCL-x^L y AKT e inhibe la actividad de MMP-2 y MMP-9, factores clave en IM. Los ratones deficientes en el receptor AT¹ presentaron menor tasa de células epiteliales apoptóticas, retardo en la invasión del estroma por adipocitos y en el depósito de fibras de colágeno con retardo en la IM postlactancia. Estos resultados sugieren la existencia de un RAS tisular funcional en la GM, donde la AngII generada localmente jugaría un rol crítico en la IM a través del R-AT1.

RESUMEN

La angiotensina II (AngII), el principal péptido efector del sistema renina angiotensina (RAS), participa en una multiplicidad de procesos biológicos como proliferación, apoptosis y remodelado tisular. Considerando que AngII activa en diversos tipos celulares señales de transducción que resultan críticos para la involución mamaria postlactancia (IM), investigamos el rol del RAS durante este proceso. Observamos que la administración exógena de AngII en las glándulas mamarias (GM) de ratones Balb/c lactantes induce apoptosis del epitelio ($2.9 \pm 0.5\%$ (control) vs. $9.6 \pm 1.1\%$ (AngII); $P < 0.001$) y activación del factor pro-apoptótico STAT3, efecto que fue inhibido por irbesartan. El estudio por qT-RT-PCR de la cinética de expresión de los componentes del RAS mostró que la enzima convertidora de angiotensina tuvo un pico a las 6 hs de IM (5.7 fold; $P < 0.01$), mientras que el angiotensinógeno, R-AT1 y R-AT2 a las 96 hs de IM (6.2, 10 y 6.2 veces de incremento, respectivamente; $P < 0.01$). Para aclarar el rol de la AngII generada en forma endógena, los ratones fueron tratados con losartan durante la IM. Dichas GM

mostraron activación de los factores de supervivencia AKT y BCL-XL, menor expresión de mRNA de LIF y TNF- α ($P<0.05$), menor apoptosis ($12.1\pm 2.1\%$ (control) vs. $4.8\pm 0.7\%$ (losartan); $P<0.001$), menor shedding de células epiteliales, inhibición de actividad de MMP-9 en forma dosis dependiente (80% ; $P<0.05$; con IC50 para losartan de 6.9 mg/kg/día) y menor depósito de colágeno e invasión de adipocitos, lo que se traduce en un retardo en la IM. Confirmando los hallazgos obtenidos utilizando antagonistas del R-AT1, las GM de ratones deficientes en las 2 isoformas del R-AT1, mostraron menor apoptosis [$6.3\pm 0.95\%$ (WT) vs. $3.3\pm 0.56\%$ (AT^{1A}/AT^{1B}DKO); $P<0.05$] con marcado retardo en la IM en comparación con ratones wild-type. Estos resultados demuestran que AngII, a través de su R-AT1, juega un rol fundamental en la IM, identificando un nuevo rol para el RAS.

REFERENCIAS

1. Nahmod, V. E., Finkielman, S., Benarroch, E. E., and Pirola, C. J. (1978) Angiotensin regulates release and synthesis of serotonin in brain. *Science* **202**, 1091-1093
2. Phillips, M. I., Speakman, E. A., and Kimura, B. (1993) Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. *Regul Pept* **43**, 1-20
3. Silver, R. B., Reid, A. C., Mackins, C. J., Askwith, T., Schaefer, U., Herzlinger, D., and Levi, R. (2004) Mast cells: a unique source of renin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13607-13612
4. Sadoshima, J. (2000) Cytokine actions of angiotensin II. *Circ Res* **86**, 1187-1189
5. Clauser, E., Curnow, K. M., Davies, E., Conchon, S., Teutsch, B., Vianello, B., Monnot, C., and Corvol, P. (1996) Angiotensin II receptors: protein and gene structures, expression and potential pathological involvements. *Eur J Endocrinol* **134**, 403-411
6. Sutherland, K. D., Lindeman, G. J., and Visvader, J. E. (2007) The molecular culprits underlying precocious mammary gland involution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **12**, 15-23
7. Chapman, R. S., Lourenco, P. C., Tonner, E., Flint, D. J., Selbert, S., Takeda, K., Akira, S., Clarke, A. R., and Watson, C. J. (1999) Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev* **13**, 2604-2616

8. Kritikou, E. A., Sharkey, A., Abell, K., Came, P. J., Anderson, E., Clark-son, R. W., and Watson, C. J. (2003) A dual, non-redundant, role for LIF as a regulator of development and STAT3-mediated cell death in mammary gland. *Development* **130**, 3459-3468
9. Schere-Levy, C., Buggiano, V., Quaglino, A., Gattelli, A., Cirio, M. C., Piazzon, I., Vanzulli, S., and Kordon, E. C. (2003) Leukemia inhibitory factor induces apoptosis of the mammary epithelial cells and participates in mouse mammary gland involution. *Exp Cell Res* **28**(10). Talhouk, R. S., Chin, J. R., Unemori, E. N., Werb, Z., and Bissell, M. J. (1991) Proteínases of the mammary gland: developmental regulation in vivo and vectorial secretion in culture. *Development* **112**, 439-449
10. Schorr, K., Li, M., Bar-Peled, U., Lewis, A., Heredia, A., Lewis, B., Knudson, C. M., Korsmeyer, S. J., Jager, R., Weiher, H., and Furth, P. A. (1999) Gain of Bcl-2 is more potent than bax loss in regulating mammary epithelial cell survival in vivo. *Cancer Res* **59**, 2541-2545
11. Walton, K. D., Wagner, K. U., Rucker, E. B., 3rd, Shillingford, J. M., Miyoshi, K., and Hennighausen, L. (2001) Conditional deletion of the bcl-x gene from mouse mammary epithelium results in accelerated apoptosis during involution but does not compromise cell function during lactation. *Mech Dev* **109**, 281-293
12. Schwertfeger, K. L., Richert, M. M., and Anderson, S. M. (2001) Mammary gland involution is delayed by activated Akt in transgenic mice. *Mol Endocrinol* **15**, 867-881
13. Inwang, E. R., Puddefoot, J. R., Brown, C. L., Goode, A. W., Marsigliante, S., Ho, M. M., Payne, J. G., and Vinson, G. P. (1997) Angiotensin II type 1 receptor expression in human breast tissues. *Br J Cancer* **75**, 1279-1283
14. Tahmasebi, M., Barker, S., Puddefoot, J. R., and Vinson, G. P. (2006) Localisation of renin-angiotensin system (RAS) components in breast. *Br J Cancer* **95**, 67-74
15. De Paepe, B., Verstraeten, V. L., De Potter, C. R., Vakaet, L. A., and Bullock, G. R. (2001) Growth stimulatory angiotensin II type-1 receptor is upregulated in breast hyperplasia and in situ carcinoma but not in invasive carcinoma. *Histochem Cell Biol* **116**, 247-254
16. Herr, D., Rodewald, M., Fraser, H. M., Hack, G., Konrad, R., Kreienberg, R., and Wulff, C. (2008) Potential role of Renin-Angiotensin-system for tumor angiogenesis in receptor negative breast cancer. *Gynecol Oncol* **109**, 418-425
17. Kodama, H., Fukuda, K., Pan, J., Makino, S., Sano, M., Takahashi, T.,

- Hori, S., and Ogawa, S. (1998) Biphasic activation of the JAK/STAT pathway by angiotensin II in rat cardiomyocytes. *Circ Res* **82**, 244-250
18. Eguchi, S., Dempsey, P. J., Frank, G. D., Motley, E. D., and Inagami, T. (2001) Activation of MAPKs by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Metalloprotease-dependent EGF receptor activation is required for activation of ERK and p38 MAPK but not for JNK. *J Biol Chem* **276**, 7957-7962
19. Quaglini, A., Salierno, M., Pellegrotti, J., Rubinstein, N., and Kordon, E. C. (2009) Mechanical strain induces involution-associated events in mammary epithelial cells. *BMC cell biology* **10**, 55
20. Oliverio, M. I., Kim, H. S., Ito, M., Le, T., Audoly, L., Best, C. F., Hiller, S., Kluckman, K., Maeda, N., Smithies, O., and Coffman, T. M. (1998) Reduced growth, abnormal kidney structure, and type 2 (AT2) angiotensin receptor-mediated blood pressure regulation in mice lacking both AT1A and AT1B receptors for angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15496-15501
21. Wang, J. M., Tan, J., and Leenen, F. H. (2003) Central nervous system blockade by peripheral administration of AT1 receptor blockers. *J Cardiovasc Pharmacol* **41**, 593-599
22. Gembardt, F., Heringer-Walther, S., van Esch, J. H., Sterner-Kock, A., van Veghel, R., Le, T. H., Garrelds, I. M., Coffman, T. M., Danser, A. H., Schultheiss, H. P., and Walther, T. (2008) Cardiovascular phenotype of mice lacking all three subtypes of angiotensin II receptors. *Faseb J* **22**, 3068-3077
23. Levy, C. S., Slomiansky, V., Gattelli, A., Nahmod, K., Pelisch, F., Blaustein, M., Srebrow, A., Coso, O. A., and Kordon, E. C. (2010) Tumor necrosis factor alpha induces LIF expression through ERK1/2 activation in mammary epithelial cells. *Journal of cellular biochemistry* **110**, 857-865
24. Gross, V., Schunck, W. H., Honeck, H., Milia, A. F., Kargel, E., Walther, T., Bader, M., Inagami, T., Schneider, W., and Luft, F. C. (2000) Inhibition of pressure natriuresis in mice lacking the AT2 receptor. *Kidney Int* **57**, 191-202
25. Gembardt, F., Sterner-Kock, A., Imboden, H., Spalteholz, M., Reibitz, F., Schultheiss, H. P., Siems, W. E., and Walther, T. (2005) Organ-specific distribution of ACE2 mRNA and correlating peptidase activity in rodents. *Peptides* **26**, 1270-1277



ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON ASMA POR ANTÍGENOS BACTERIANOS.

Constanza Otero

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina.

INTRODUCCIÓN

El asma es una enfermedad, en cuya fisiopatogenia interviene la respuesta inmune celular con franco predominio de citoquinas (CKs) tipo Th2 (interleuquina (IL)-4; IL-5; IL-6; IL-9; IL-10; IL-13), las que estimulan el crecimiento, diferenciación y reclutamiento de mastocitos, basófilos, eosinófilos y linfocitos B, involucrados en inmunidad humoral, inflamación y respuestas alérgicas; creando un microentorno que promueve la síntesis de IgE (1). Algunos estudios sugieren que el balance entre linfocitos Th2 y células T regulatorias alérgicas específicas es decisivo en el desarrollo de las alergias (2,3) y recientemente se atribuyó un papel a los linfocitos Th17 (4).

Se trata de una enfermedad frecuente caracterizada por la inflamación crónica de las vías aéreas y la obstrucción bronquial recurrente, cuya resolución puede ser espontánea o como respuesta al tratamiento (5). La mayoría de los casos de asma son atópicos. En los pacientes con asma la hipersecreción mucosa disminuye la capacidad del *clearance* ciliar, facilitando infecciones virales que desencadenan el cuadro asmático. En esas condiciones se producen infecciones bacterianas secundarias a la infección viral, siendo el *Streptococcus (S.) pneumoniae* el agente causal más frecuente mientras que las infecciones con otro tipo de patógenos como el *Mycobacterium (M.) tuberculosis* son muy poco frecuentes.

Se propuso evaluar la respuesta inmune de pacientes con asma atópico frente a bacterias que causan infecciones respiratorias, con el objeto de estudiar si la presencia de una respuesta de tipo Th2 en curso en los individuos asmáticos, es capaz de determinar una respuesta inmune diferencial frente al *S.pneumoniae* (Spn); dado que estos pacientes se infectan con neumococos pero no se ha documentado en ellos una mayor prevalencia de tuberculosis pulmonar.

En la defensa contra el Spn, la respuesta inmune se basa en anticuerpos dirigidos hacia antígenos polisacáridos capsulares y se consideró histórica-

mente independiente de la colaboración de los linfocitos T (LT). Sin embargo una serie de publicaciones recientes describen también un papel de los LT en este tipo de respuesta tanto en modelos murinos (6, 10), como en humanos (7); aunque el rol de estas células en la defensa contra el neumococo no ha sido del todo dilucidado. En cambio, en la infección por el patógeno intracelular *M. tuberculosis* (Mtb) el rol de la respuesta T se encuentra ampliamente descripto, incluyendo mecanismos de defensa mediados tanto por LT CD4 y CD8 convencionales como por LT gd (8,9).

Estos antecedentes permiten proponer como hipótesis de trabajo que la susceptibilidad de estos pacientes a contraer infecciones con neumococos podría ser explicada por defectos en la respuesta inmune con contribución de los LT, como consecuencia de su patología. Estos defectos podrían estar asociados al hecho particular de que el paciente se encuentre en un período de exacerbación asmática (crisis) o de estabilidad (intercrisis). Para poner a prueba dicha hipótesis se propuso evaluar la respuesta inmune adaptativa al Spn y al Mtb, en pacientes asmáticos durante ambos periodos. Se estudiaron las células mononucleares de sangre periférica (CMNP) de pacientes pediátricos con asma atópico, mediante la caracterización de las distintas subpoblaciones linfocitarias y la evaluación de parámetros de activación y proliferación de linfocitos frente a antígenos bacterianos.

MATERIALES Y MÉTODOS

En total se estudiaron 26 pacientes pediátricos con asma atópico de 7 a 20 años de edad. Los criterios de selección fueron: dosaje de IgE elevado para la edad; historia de hiperreactividad bronquial: más de dos crisis de broncoespasmos por año; y pacientes positivos para tests cutáneos ante diferentes alérgenos. Las muestras de sangre periférica fueron tomadas durante la exacerbación asmática o en un momento de estabilidad. Durante el período de estudio hubo 13 pacientes a los que se les pudo extraer sangre tanto en el momento de crisis como en el de intercrisis. Solo estos se tomaron en cuenta para el análisis de datos.

Los pacientes recibieron toda la información necesaria para prestar voluntariamente consentimiento informado.

Se obtuvieron células mononucleares a partir de muestras de sangre periférica, mediante un gradiente de Ficoll-Hypaque.

Se realizaron cultivos a 48 hs, en presencia de los antígenos

S.pneumoniae ATCC 49619 (Spn), cultivado, lavado e inactivado por calor, provisto por el Laboratorio de Bacteriología Central del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS Dr Malbrán.; *M.tuberculosis* H37-RV (Mtb), cultivado e inactivado por calor, provisto por el Servicio de Micobacterias del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS Dr Malbrán; o en ausencia de ellos (Control).

Se determinaron las subpoblaciones linfocitarias que expresan CD3, CD4, CD8 y $\gamma\delta$, midiendo la expresión de marcadores de activación de los linfocitos: CD69 (activación temprana) o CD25 (activación tardía) en el momento inicial (0hs) y a 48hs de cultivo, mediante citometría de flujo. Se marcaron las células con anticuerpos monoclonales conjugados con distintos fluorocromos. Se consideró a los LT CD3+CD4- como LTCD8+.

Para comparar los parámetros evaluados a 0hs entre crisis e intercrisis se utilizó el Wilcoxon rank test. Para evaluar el grado de estimulación que presentaban las CMNP de los pacientes dentro de cada situación (crisis o intercrisis) a 48hs de cultivo, se utilizó un test de ANOVA de mediciones repetidas; dicho test se confirmó con un test de Tukey para comparaciones múltiples. Para contrastar cada estímulo (Spn o Mtb) entre crisis e intercrisis se normalizaron los datos a los valores de control sin estímulo y se utilizó también el Wilcoxon rank test para comparar el grado de activación frente a un mismo antígeno durante el período de crisis y el de intercrisis de un mismo paciente.

RESULTADOS

Como ya se mencionó, si bien la defensa contra el Spn siempre se ha considerado T independiente, en los últimos años se ha descripto una función para la respuesta T (10, 6,7). Por ello decidimos estudiar algunos parámetros de activación de los LT, tanto a 0hs como a 48hs en presencia o no de los antígenos bacterianos. Como puede verse en la **Tabla 1**, a 0hs no encontramos diferencias significativas en cuanto a la expresión tanto de CD69 como de CD25, para los distintos tipos de LT, entre los pacientes en período de estabilidad (Intercrisis) y los pacientes en período de exacerbación (Crisis).

Tabla 1: Parámetros de activación de las distintas subpoblaciones T a 0hs medidos en cada paciente tanto en momentos de estabilidad como en momentos de exacerbación asmática.

Pacientes asmáticos a 0hs		
	Crisis	Intercrisis
% LT activados:		
LT $\gamma\delta$ CD69+	5,20 + 0,95	6,61 + 1,19
LT CD69+	2,51 + 0,36	2,18 + 0,45
LT CD4+ CD25+	7,5 + 1,11	7,65 + 4,50
LT CD8+ CD25+	0,64 + 0,11	0,88 + 0,19

Los LT $\gamma\delta$ cumplen un rol importante en la defensa contra el Mtb (11) y también contra el Spn, aunque en menor medida (12). Por ello decidimos estudiar su activación temprana también a 48hs de cultivo en presencia de dichos antígenos. Los pacientes en intercrisis presentaron un aumento significativo del porcentaje de LT $\gamma\delta$ CD69+ frente al estímulo con Mtb, pero no frente al estímulo con Spn (fig 1a); mientras que, durante la crisis, estos pacientes presentaron un aumento significativo del porcentaje de dichas células, para ambos antígenos (fig 1b).

En cuanto a los LT CD69+ hubo un aumento en el porcentaje de los mismos frente al estímulo con Mtb tanto para los pacientes en crisis, como en intercrisis, (fig 1c y d) siendo mayor la respuesta en el segundo caso. No hubo un aumento significativo del porcentaje de LT CD69+ frente al estímulo con Spn, con respecto al control, en ninguno de los dos estados (fig 1c y d).

Con respecto al porcentaje de los LT CD4+CD25+, en los pacientes en el período de intercrisis se vio un aumento frente al estímulo con Mtb y no frente al Spn, con respecto al control (fig 1e). En los pacientes en período de crisis no hubo aumento en la respuesta frente a ninguno de los dos estímulos (fig 1f).

El porcentaje de LT CD8+CD25+ aumentó en los pacientes en ambos períodos frente al estímulo con Mtb y no frente al Spn, con respecto al control (fig 1g y 1h); pero la respuesta observada para los pacientes en intercrisis parece ser mayor que durante la crisis (fig 1g).

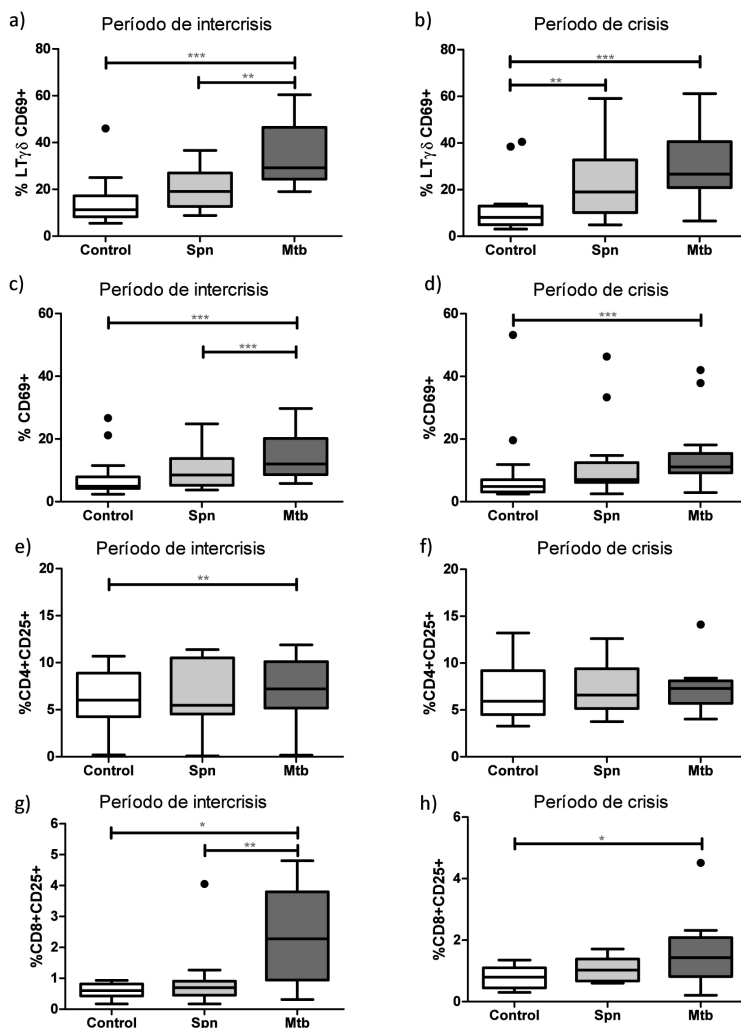


Figura 1. Porcentaje de estimulación de las CMNP de los pacientes durante los periodos de intercrisis : a), c), e) y g) y crisis: b), d), f) y h) a 48hs de cultivo. Test de ANOVA y Tukey * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ y *** $p < 0.0001$

Para evaluar la respuesta frente al mismo estímulo (Mtb o Spn) entre los dos estados (intercrisis vs. crisis) se compararon los porcentajes de los LT $\gamma\delta$ CD69+, LT CD69+, LT CD4+CD25+ y LT CD8+CD25+ normalizando los resultados al control sin estímulo. Se vio una tendencia a una mejor respuesta de las células de estos pacientes frente al estímulo con Spn durante el período de crisis y, por el contrario, una mejor respuesta frente al Mtb durante el período de estabilidad. En ninguno de los casos se encontraron diferencias significativas; se muestra el ejemplo para los LT $\gamma\delta$ CD69+ (fig 2), el resto de los marcadores dieron resultados similares (datos no mostrados).

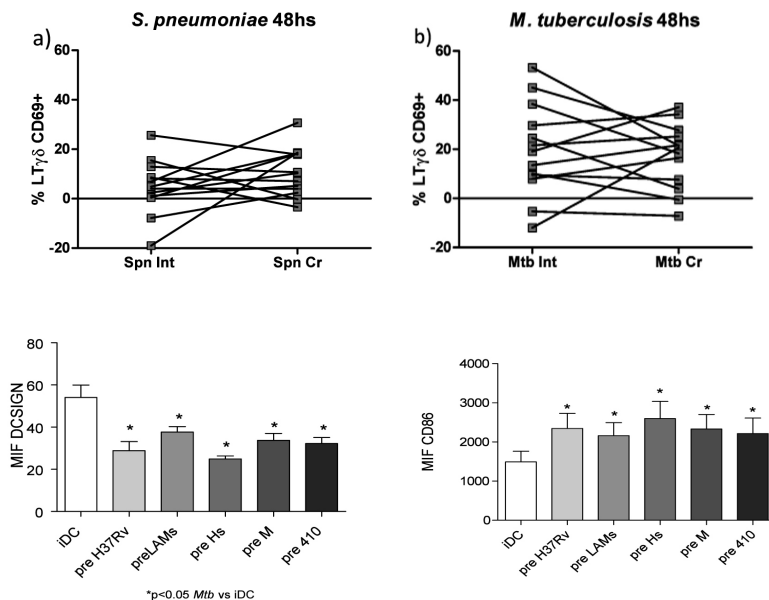


Figura 2. Porcentaje de LT $\gamma\delta$ CD69+ a 48hs de cultivo con a) Spn y b) Mtb. Test de Wilcoxon.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los pacientes asmáticos sufren de una exacerbación aguda de sus síntomas, disparada por varios estímulos que pueden ser exógenos o endógenos. Esto resulta en una carga sobre el sistema de salud, dado que representa alre-

dedor del 50% de los costos asociados al asma; además, la recurrencia de las crisis asmáticas afecta la calidad de vida de los pacientes (13). En general, la mayor parte del tiempo, los pacientes se encuentran en condición estable, con ausencia de síntomas de exacerbación asmática (14). Por ello decidimos evaluar distintos parámetros de la respuesta inmune dentro de cada paciente tanto en momentos de estabilidad, como en momentos de crisis asmática, para ver si existían diferencias entre ambos estados. La respuesta inmune frente a antígenos puede ser evaluada en los linfocitos mediante la expresión de marcadores de activación y proliferación, como CD69 o CD25, o mediante la producción de CKs, luego del estímulo de CMNP con el antígeno. Recientemente se ha propuesto que la molécula CD69 cumpliría una función regulatoria en el asma de origen alérgico y otras enfermedades inflamatorias; modulando negativamente la diferenciación de los LT hacia el linaje Th17 (15, 16). Otros autores han reportado que el CD69 juega un papel crucial en la patogénesis de la inflamación eosinofílica y la hiperrespuesta de las vías aéreas, inducido por alérgenos (17). No encontramos diferencias significativas entre los pacientes durante el período de estabilidad y el período de crisis asmática, para la expresión de CD69 en los LT y LT $\gamma\delta$ a 0hs. Al evaluar la expresión del mismo a 48hs de cultivo, pudimos ver que los LT de los pacientes en ambos estados, son capaces de aumentar el porcentaje de CD69 frente al estímulo con Mtb, pero no frente al estímulo con Spn. Solo los LT $\gamma\delta$ de los pacientes asmáticos en crisis, fueron capaces de aumentar el porcentaje de CD69 frente al estímulo tanto con Spn, como con Mtb. Esto puede explicar por qué los pacientes asmáticos presentan una respuesta diferencial frente al neumococo, dado que se ha descrito que, para la defensa contra el mismo, puede ser importante la modulación de los LT a los perfiles Th1 y Th17 (18).

En cuanto a la expresión de CD25, tanto de los LT CD4+, como los LT CD8+, no se vio un aumento del porcentaje de células dobles positivas frente al estímulo con Spn en ninguno de los estados del paciente; pero sí frente al estímulo con Mtb (salvo los LT CD4+ durante el período de crisis). El CD25 aumenta su expresión en los LT de forma tardía, y es necesario para su correcta proliferación. En nuestro caso es esperable que no haya un aumento en la expresión del mismo frente al Spn, siendo que el CD69, que es un marcador de activación temprana, tampoco aumentó su expresión frente al mismo estímulo. Creemos que es posible que el entorno de CKs de perfil Th2 en el que se encuentran las células de estos pacientes pueda influir sobre la diferenciación, activación y proliferación celular, impidiendo la generación de los perfiles necesarios para la respuesta efectiva contra el neumococo. Esto podría verse

reflejado en la expresión diferencial del marcador CD69 que presentan los LT, frente al estímulo con Spn en los pacientes asmáticos, ya descrita.

En las poblaciones celulares estudiadas no se han encontrado diferencias significativas en la respuesta para un dado paciente ante el Spn o el Mtb, al comparar los momentos de estabilidad o de crisis. Sin embargo, parecería haber una tendencia a una mayor respuesta frente al Spn durante el período de crisis. Probablemente se podrían detectar diferencias significativas si fuera posible tener acceso a células presentes en el órgano blanco.

ABSTRACT

Asthma is characterized by chronic airway inflammation, with high mucus production and airway hyperresponsiveness. A Th2 mediated immune response prevails in these patients. The asthmatic exacerbation period (crisis) can be triggered by viral infections or other factors, and there is a high prevalence of bacterial overinfection, generally by *Streptococcus pneumoniae* (Spn); and not by other respiratory pathogens like *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Historically, defense against Spn has been considered as T cell independent, but recently it has been described that activation of Th1 and Th17 responses may be crucial for resolution of the infection. Our objective was to compare immunological parameters and in vitro response of T lymphocytes (TL) to bacterial antigens in the same patient, at the moment of asthmatic crisis and at a time of stability between episodes (intercrisis). We studied 13 asthmatic patients in both conditions. Evaluation was performed by flow cytometry in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). We studied the presence of CD3, CD4, CD8 and $\gamma\delta$ TL from PBMC at 0 hours. No significant differences were found for the same asthmatic patient in the two situations. To evaluate the T cell response, PBMC were cultured for 48 hours in the presence of Spn, Mtb, or absence of them (control). Then the percentage of activated CD3, CD4, CD8 and $\gamma\delta$ T cells was determined by the expression of CD69 or CD25. It has been proposed that CD69 plays a regulatory role in allergic asthma, negatively modulating the differentiation of TL to Th17 cells. It has also been reported that CD69 is involved in the pathogenesis of eosinophilic inflammation and airway hyperresponsiveness, induced by allergen. TL of patients in both states were able to increase, significantly ($p < 0.01$), the percentage of CD69 in culture only with Mtb, but not with Spn. Only the $\gamma\delta$ TL of asthmatic patients during a crisis, increased the expression of CD69 with both stimuli ($p < 0.01$). As for CD25, its expression did not increase in CD4+ and CD8+ TL, with Spn, in neither of both situations. There was an increase of the percentage of CD25+ TL, with Mtb

($p < 0.05$) in both states (except CD4+ TL during crisis). This is consistent with the fact that expression of CD69 (an early activation marker) did not increase with Spn, as CD25 is a late activation marker, required for proper proliferation of TL. It is possible that the Th2 cytokine environment in which T cells are found in these patients, may influence the correct differentiation, activation and cell proliferation, required for an effective response against Spn. This would be reflected in the differential expression of CD69 in TL, with Spn stimulation. In the studied T cell subpopulations, we didn't find significant differences in the response, for a given patient, to Spn or Mtb, comparing the states of stability or crisis. However, there seems to be a tendency to a greater response to Spn, during the crisis period. We could probably detect significant differences if we had access to cells from the lungs, the target organ.

BIBLIOGRAFÍA

1. Elias JA, Lee CG, Zheng T, Ma B, Homer RJ, Zhu Z. *New insights into the pathogenesis of asthma*. J Clin Invest. 2003; 111(3): 291-7.
2. Kuipers H, Lambrecht BN. *The interplay of dendritic cells, Th2 cells and regulatory T cells in asthma*. Curr Opin Immunol. 2004; 16(6):702-8.
3. Akbari O, Stock P, DeKruyff RH, Umetsu DT. *Role of regulatory T cells in allergy and asthma*. Curr. Opin. Immunol. 2003; 15: 627-33.
4. Wakashin H, Hirose K, Iwamoto I, Nakajima H. *Role of IL-23-Th17 cell axis in allergic airway inflammation*. Int. Arch Allergy Immunol 2009; 149 Suppl 1:108-12.
5. Hoshino A, Tsuji T, Matsuzaki J, Jinushi T, Ashino S, Teramura T, Chamoto K, Tanaka Y, Asakura Y, Sakurai T, Mita Y, Takaoka A, Nakaie S, Takeshima T, Ikeda H, Nishimura T. *STAT6-mediated signaling in Th2-dependent allergic asthma: critical role for the development of eosinophilia, airway hyper-responsiveness and mucus hypersecretion, distinct from its role in Th2 differentiation*. Int. Immunol. 2004; 16(10): 1497-505.
6. Vasilevsky S, Chattopadhyay G, Colino J, Yeh TJ, Chen Q, Sen G, Snapper CM. *B and CD4+ T-cell expression of TLR2 is critical for optimal induction of a T-cell-dependent humoral immune response to intact Streptococcus pneumoniae*. Eur J Immunol. 2008 Dec; 38(12): 3316-26.
7. Olliver, M., Hiew, J., Mellroth, P., Henriques-Normark, B. & Bergman, P. *Human monocytes promote Th1 and Th17 responses to Streptococcus pneumoniae*. Infection and immunity 79, 4210-7 (2011).

8. Lamichhane G, Bishai W. *Defining the .survivasome. of Mycobacterium tuberculosis*. Nature Medicine 2007 13(3): 280-282.
9. Warner DF, Mizrahi V. *The survival kit of Mycobacterium tuberculosis*. Nature Med 2007 13(3): 282-284.
10. Lu, Y.-J., J. Gross, D. Bogaert, A. Finn, L. Bagrade, Q. Zhang, J. K. Kolls, A. Srivastava, A. Lundgren, S. Forte, C. M. Thompson, K. F. Harney, P. W. Anderson, M. Lipsitch, and R. Malley. 2008. *Interleukin-17A mediates acquired immunity to pneumococcal colonization*. PLoS pathogens 4: e1000159.
11. Chen, Z. W. 2005. *Immune regulation of $\gamma\delta$ T cell responses in mycobacterial infections*. Clin Immunol 116: 202-207.
12. Kirby, A. C., D. J. Newton, S. R. Carding, and P. M. Kaye. 2007. *Evidence for the involvement of lung-specific gammadelta T cell subsets in local responses to Streptococcus pneumoniae infection*. European journal of immunology 37: 3404-13.
13. Clarke, D. L., R. L. Clifford, S. Jindarat, D. Proud, L. Pang, M. Belvisi, and A. J. Knox. 2010. *TNF α and IFN γ synergistically enhance transcriptional activation of CXCL10 in human airway smooth muscle cells via STAT-1, NF- κ B, and the transcriptional coactivator CREB-binding protein*. The Journal of biological chemistry 285: 29101-10.
14. Holgate, S. T. 2008. *Pathogenesis of asthma*. Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology 38: 872-97.
15. Martín, P., M. Gómez, A. Lamana, A. Cruz-Adalia, M. Ramírez-Huesca, M. A. Ursa, M. Yáñez-Mo, and F. Sánchez-Madrid. 2010. *CD69 association with Jak3/Stat5 proteins regulates Th17 cell differentiation*. Molecular and cellular biology 30: 4877-89.
16. Martín, P., and F. Sánchez-Madrid. 2011. *CD69: an unexpected regulator of TH17 cell-driven inflammatory responses*. Science signaling 4: pe14.
17. Miki-Hosokawa, T., A. Hasegawa, C. Iwamura, K. Shinoda, S. Tofukuji, Y. Watanabe, H. Hosokawa, S. Motohashi, K. Hashimoto, M. Shirai, M. Yamashita, and T. Nakayama. 2009. *CD69 controls the pathogenesis of allergic airway inflammation*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) 183: 8203-15.
18. Olliver, M., J. Hiew, P. Mellroth, B. Henriques-Normark, and P. Bergman. 2011. *Human monocytes promote Th1 and Th17 responses to Streptococcus pneumoniae*. Infection and immunity 79: 4210-7.

POSIBLE ESTRATEGIA TERAPÉUTICA PARA LA PREVENCIÓN DEL SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA (OHSS)

Dra. Fernanda Parborell (Directora); Lic. Leopoldina Scotti (becaria); Dra. Dalhia Abramovich (becaria)
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)

RESUMEN

En el adulto, el ovario es uno de los pocos órganos donde ocurre el desarrollo, mantenimiento y regresión de vasos sanguíneos. Si bien los folículos preantrales no poseen vasculatura propia a medida que el antro se desarrolla durante la foliculogénesis, el tejido tecal adquiere vasculatura en forma de dos redes capilares en la teca externa e interna. Se ha postulado que el desarrollo y crecimiento de estos capilares estaría controlado por factores angiogénicos producidos por las células de granulosa. Estos factores actuarían en forma conjunta, estimulando el crecimiento y mediando la reorganización de células endoteliales en estructuras vasculares más complejas. Entre estos factores, se destacan el VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular), ANGPTs (angiopoietina 1 y 2) y PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas).

Los defectos en la angiogénesis ovárica pueden contribuir a una variedad de desórdenes como la anovulación e infertilidad, la pérdida de embarazo, el síndrome de hiperestimulación ovárica (OHSS), la poliquistosis ovárica (PCOS) y los neoplasmas ováricos.

Una de las características que poseen las pacientes con OHSS es poseer una angiogénesis alterada donde se observan niveles elevados de VEGFA en suero.

El OHSS es una complicación iatrogénica severa del crecimiento y maduración folicular ocasionada por la inducción de la ovulación con gonadotrofinas en tratamientos de fertilización asistida (Assistant Reproductive Technic, ART). Aunque la prevalencia de la forma severa de OHSS es baja (0,3-5% de ciclos de estimulación), es importante destacar que el OHSS es una complicación causada por ART que en algunos casos puede tener resultados fatales. Las características de la enfermedad involucran: aumento en el tamaño del ovario, sobreproducción de hormonas esteroideas y sustancias como citoquinas, angiotensina y VEGF, contribuyendo de esta manera

al aumento de permeabilidad vascular, presencia de ascitis y formación de quistes. Estos quistes son de tejido luteal y hemorrágicos, y probablemente el mecanismo se deba a un aumento de la proliferación/diferenciación de las células foliculares y/o a la inhibición de la apoptosis.

En la actualidad, es escasa la información que se dispone acerca de la patofisiología de la enfermedad y de sus posibles tratamientos, si bien el VEGFA es el principal candidato involucrado en la patogénesis de OHSS.

Por lo tanto, postulamos las siguientes hipótesis:

a) En el ovario, los factores angiogénicos, VEGFA y ANGPT-1, producidos por las células de granulosa o luteales, poseen una acción intraovárica alterando el crecimiento y diferenciación folicular normal, contribuyendo su sobreexpresión a la aparición de OHSS.

b) El bloqueo de la acción de VEGFA, disminuirá la permeabilidad vascular que conduce a la presencia de ascitis en las pacientes con alto a riesgo a desarrollar OHSS.

En base a las consideraciones planteadas en el apartado anterior, se ejecutaron los siguientes objetivos:

- 1) Estudiar el efecto in vivo que produce el bloqueo de la acción del factor angiogénico VEGFA en un modelo de OHSS desarrollado en rata sobre:
 - el peso ovárico
 - la esteroidogénesis ovárica
 - la foliculogénesis y la formación de cuerpos lúteos y quistes
 - la proliferación celular y la luteólisis (apoptosis luteal)
 - la madurez de los vasos sanguíneos en el ovario
 - la expresión de los factores angiogénicos PDGF-D, ANGPT-1, ANGPT-2 y Tie-2
 - la permeabilidad vascular
- 2) Evaluar la expresión de los miembros de la familia del sistema ANGPT/Tie-2 en fluidos foliculares provenientes de pacientes sometidas a técnicas de reproducción asistida (ART) con alta probabilidad de desarrollar OHSS.

En la primer parte de este trabajo, demostramos por primera vez que la administración del inhibidor de VEGF, Trap, durante 48 hs y 72 hs en un modelo de OHSS desarrollado en roedor estaría interfiriendo en la esteroidogénesis y en el desarrollo folicular y luteal. Este efecto estaría mediado en parte

por una disminución del índice de proliferación y un aumento en la apoptosis en los cuerpos lúteos (CL) provenientes del modelo mencionado. Cabe resaltar, que este modelo de OHSS es ampliamente utilizado por otros investigadores 43;44 para dilucidar la etiología y los mecanismos que regulan dicho síndrome. Previamente, hemos demostrado que en este modelo se encuentra aumentado el peso del ovario, la progesterona sérica y los niveles de estradiol, la concentración peritoneal de VEGF y su receptor principal, Flk-1 42, siendo estas características observadas en las pacientes con alta probabilidad de desarrollar el síndrome. Además, en nuestro laboratorio, observamos que la proteína claudina-5 (proteína endotelial de las uniones estrechas y una de las proteínas esenciales para regular la permeabilidad vascular) se encuentra disminuida en ovarios provenientes del modelo OHSS. Consistente con este resultado, Kitajima et al 44 observaron en estos animales que existe una disminución en la expresión de claudina-V y, por consiguiente, un aumento en la permeabilidad vascular y la presencia de ascitis, siendo ésta uno de los principales síntomas de las pacientes con OHSS.

En humanos, OHSS causa la formación de múltiples cuerpos lúteos (CLs) y aumenta la expresión de VEGF 45, el cual es principalmente sintetizado por células foliculares y luteales. El VEGF no solo es un factor pro-angiogénico sino que también es un factor que aumenta la permeabilidad vascular. En este trabajo demostramos que la inhibición de VEGF disminuye el número de CL en el modelo OHSS de rata. Además, cabe destacar que el inhibidor Trap, aumentó el porcentaje de folículos atróficos. Por lo tanto, estas observaciones sugieren que la inhibición in vivo de VEGF podría alterar el desarrollo luteal, retrasando la foliculogénesis, llevando a un mayor número de folículos a la atresia y, por consiguiente, a un menor número de CLs y quistes del tipo hemorrágicos presentes en ovarios de ratas OHSS. Además, estos resultados son relevantes considerando que en este síndrome existe un alto número de folículos desarrollados y CLs asociados a una angiogénesis excesiva. Como el aumento de la permeabilidad vascular es una característica esencial en OHSS y es la causante de la presencia de ascitis en dicho síndrome, se evaluó el efecto de la inhibición del VEGF sobre la expresión de la proteína claudina-V en el modelo de OHSS. Los resultados mostraron que el Trap aumentaba los niveles proteicos de la claudina-V en el grupo OHSS comparado al grupo OHSS sin tratar. Estos resultados sugerirían que la inhibición del VEGF disminuiría la permeabilidad vascular en el OHSS ya que favorece la expresión de esta claudina V que está presente en las uniones estrechas entre células endoteliales y es esencial en este proceso.

Por otra parte, teniendo en cuenta que el sistema de PDGF es indispensable para el reclutamiento de células periendoeliales luego de ser estabilizadas por el sistema de ANGPTs, nos propusimos evaluar los niveles de uno de los miembros de la familia de PDGF, el PDGF-D, en ovarios provenientes del modelo de OHSS desarrollado en roedor. Los resultados mostraron una disminución en los niveles proteicos de PDGF-D en el grupo de OHSS comparado al grupo control. Sin embargo, el inhibidor de VEGF fue capaz de revertir los niveles de PDGF-D en los ovarios procedentes del modelo de OHSS. Estos resultados sugerirían que el tratamiento con Trap es capaz de aumentar los niveles proteicos de PDGF-D en el modelo de OHSS, permitiendo un mayor reclutamiento de células peri-endoeliales a la vasculatura y, probablemente, favoreciendo a la madurez de la misma.

En segundo lugar, varios estudios han demostrado que el VEGF es un candidato importante como un mediador de OHSS. Por otro lado, existe otro sistema vasoactivo, el sistema de ANGPTs, que es también indispensable para el desarrollo de los vasos sanguíneos, y probablemente, posea un rol importante en OHSS, siendo un síndrome con una angiogénesis alterada. Por lo tanto, teniendo en cuenta que nosotros observábamos una alta expresión de ANGPT-1 y su receptor Tie-2 en CLs provenientes de ovarios del modelo de OHSS desarrollado en rata, y un elevado porcentaje de células periendoeliales en estos CLs, se decidió evaluar los niveles de ANGPT-1 y su receptor soluble Tie-2 en FF (fluido folicular) provenientes de pacientes con alto riesgo de desarrollar OHSS comparado a FF de pacientes normoponderadas. Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que los niveles de ANGPT-1 están aumentados y los niveles del receptor soluble Tie-2 se mantienen constantes en FF de mujeres que poseen alta probabilidad de desarrollar OHSS. Este receptor es secretado por células foliculares y endoteliales y actúa como un receptor antagonista secuestrando ANGPT-1 libre. Estos resultados sugerirían que existe una mayor disponibilidad de ANGPT-1 al receptor de membrana Tie-2, y que a su vez, aumenta la angiogénesis fisiopatológica en pacientes con alto riesgo a desarrollar OHSS. Estos resultados fueron corroborados por la técnica de western blot, donde se observó un aumento en los niveles proteicos de ANGPT-1, permaneciendo constantes los niveles de ANGPT-2, en pacientes con alta probabilidad de desarrollar OHSS.

Todos estos resultados obtenidos nos llevan a pensar que los niveles aumentados de ANGPT-1 y su receptor Tie-2 de membrana (sin cambios en los niveles del receptor soluble Tie-2) observados en OHSS, provocan

una falta de regulación en el equilibrio del sistema vascular. A simple vista estos resultados parecerían contradictorios porque el sistema de ANGPTs estabiliza a las células endoteliales y peri-endoteliales y, por consiguiente, disminuiría la permeabilidad vascular. Sin embargo, este sistema no es el único involucrado en la madurez vascular sino que también se requiere la participación indispensable y coordinada de otros sistemas. El sistema de PDGF posee un rol importante para la expansión de la población de células de músculo liso y para la migración de estas células a lo largo del crecimiento vascular 53. Además, Uutela et al 46 mostró que el PDGF-D y PDGF-B favorecen el reclutamiento de las células peri-endoteliales en la vasculatura y disminuyen su permeabilidad. Este trabajo es consistente con nuestros resultados ya que nosotros observamos una disminución en los niveles proteicos de PDGF-D en ovarios provenientes del modelo de OHSS desarrollado en roedor. Asimismo, el inhibidor de VEGF (Trap) es capaz de aumentar los niveles del PDGF-D en ovarios provenientes del modelo de OHSS. Estos resultados sugerirían que el tratamiento con Trap disminuye la permeabilidad vascular observada en la patología de OHSS. Cabe resaltar que existe otro sistema involucrado en la maduración de la vasculatura, el sistema de esfingosina-1 fosfato (S1P). S1P (o endoglinas, EDG) es un esfingolípido bioactivo que media una amplia variedad de respuestas celulares a través de la interacción con los miembros de la familia de genes de diferenciación de las células endoteliales de receptores acoplados a la proteína G localizados en la membrana plasmática. Hasta la fecha se han identificado cinco miembros de esta familia como receptores S1P en distintos tipos de células (S1P1/EDG-1; S1P2/EDG-5; S1P3/EDG-3; S1P4/EDG-6 y S1P5/EDG-8). En particular, se ha demostrado que la interacción de S1P con los receptores S1P1 desempeña un importante papel en la maduración vascular in vivo 54. S1P al unirse a su receptor promueve la traslocación de la N-caderina (proteína clave de las uniones adherentes) a la membrana plasmática y favorece el contacto entre la célula endotelial y el pericito, disminuyendo de esta manera la permeabilidad vascular. Por lo tanto, todos estos datos junto a nuestros resultados sugerirían que, en OHSS donde se observa una alta permeabilidad vascular, las células peri-endoteliales son inicialmente estabilizadas por el sistema de ANGPTs, pero posiblemente esta población de células fallan en expandirse y distribuirse a lo largo de los microvasos y/o fallan en establecerse en un endotelio normal. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los cambios observados en la expresión de la claudina V y PDGF-D podrían estar involucrados en este proceso. Actualmente, se están llevando a cabo

estudios en nuestro laboratorio para dilucidar el rol de otras isoformas de PDGF y del sistema de S1P en la patología de OHSS.

En conclusión, la falla en los mecanismos que regulan una angiogénesis normal podría ser responsable de enfermedades reproductivas femeninas, tales como OHSS, PCOS, pérdida temprana del embarazo, endometriosis y neoplasmas benignos o malignos. Por lo tanto, la comprensión de la fisiología de estos factores y la manera en la que participan en la patogenia de estas enfermedades, en particular en OHSS, es fundamental para proponer medidas de prevención/predicción y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

SUMMARY

In the adult, the ovary is one of the few organs in which development and regression of blood vessels occurs. The ovarian vascular development is controlled by angiogenic factors produced by follicular/luteal and endothelial cells. Some of these factors are: VEGF (vascular endothelial growth factor), ANGPTs (angiopoietins) and PDGF (platelet derived growth factor). The defects in ovarian angiogenesis may contribute to a variety of disorders such as infertility, ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) and polycystic ovary syndrome (PCOS). OHSS is an iatrogenic complication of severe follicular growth and maturation caused by ovulation induction with gonadotrophins. Some characteristics of OHSS involve overproduction of angiogenic substances such as VEGF, thereby contributing to increased vascular permeability. There is little information available about the pathophysiology of the disease and its treatment. We postulate the following hypotheses: a) the ovarian overexpression of VEGF and ANGPT-1 alters the normal follicular growth and contributes to the development of OHSS and b) the inhibition of VEGF decreases the vascular permeability in this pathology.

The results showed that the inhibition of VEGF by Trap (48h and 72h) in a rat OHSS model interferes in steroidogenesis, and follicular/luteal development. Besides, the Trap increased the protein levels of claudin-V (tight junction endothelial protein) and PDGF-D in the OHSS group compared to untreated OHSS group. On the other hand, the results obtained in human follicular fluids showed that ANGPT-1 levels are increased and levels of soluble receptor Tie-2 are constant in patients with high probability of developing OHSS.

In conclusion, the failure in the mechanisms that regulate a normal angiogenesis could be responsible for female reproductive diseases, such as OHSS, PCOS and neoplasms. Therefore, understanding of the physiology of these factors and how they participate in the pathogenesis of these diseases, particularly in OHSS, it is essential to propose preventive measures and develop new therapeutic strategies.



POTENCIAL ROL DE LA HISTAMINA COMO RADIOPROTECTOR DE LA ESTRUCTURA Y FUNCIONALIDAD DE LA GLANDULA SUBMAXILAR

Prestifilippo, JP, Ph.D¹; Prof Ph.D Juan Carlos Elverdin¹
y Ph.D Vanina Medina^{2,3}

¹Cátedra de Fisiología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires;

²Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; ³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

MATERIALES Y MÉTODO:

Para el desarrollo de este proyecto de investigación se utilizarán ratas Wistar macho adultas (300-350 g). Los mismos serán separados en cuatro grupos: Controles, tratados con histamina, irradiados con dosis fraccionadas de 2 Gy e irradiados y tratados con histamina. Se utilizará un equipo de irradiación con una fuente de ⁶⁰Co, tipo Teradi (Laboratorio Tandem, Departamento de Radiobiología, CNEA). La irradiación en cuerpo entero se llevará a cabo con una única dosis (5-10 Gy) con una fuente de ¹³⁷Cs (Equipo IBL 437C tipoH, CEBIRSA S.A.); la histamina se administrarán 24 horas antes de la irradiación y se continuarán hasta el sacrificio los animales, al 3° día post-irradiación.

Para la construcción de las curvas dosis respuesta (CDR), en los estudios de secreción salival, las ratas serán anestesiadas y los conductos de las Glandula Submaxilares (GSMs) serán canulados para poder obtener la saliva. La secreción salival será inducida por metacolina (metacolina, 0.3, 1, 3 y 10 mg/kg) inyectada a través de la vena femoral. La saliva será recolectada en papel de aluminio y pesada en balanza analítica. Los resultados serán expresados en mg de saliva. A partir de la evaluación de la cantidad de saliva secretada luego de cada inyección, se construirán las CDR de cada animal. Cabe aclarar que los animales bajo anestesia no presentan secreción basal de saliva. Las alteraciones óseas, se evaluarán mediante técnicas histomorfométricas a nivel de los primeros molares inferiores. Luego de los tratamientos, en todos los grupos se evaluará la los estudios histopatológicos de las alteraciones microscópicas más importantes por tinción con hematoxilina-eosina. Para los estudios inmunohistoquímicos los cortes de las GSM se

desparafinarán y se realizará la exposición del antígeno por calentamiento en tampón citrato (10 mM, pH 6.0) La actividad de peroxidasa endógena se bloqueará mediante una incubación con H₂O₂ 3% en agua destilada por 30 min. Luego los cortes se incubarán en cámara húmeda con los anticuerpos primarios para determinar la expresión de PCNA, BrdU, Bax, Bcl2, phospho-H2A.X (Ser 139). Posteriormente, se incubarán con los respectivos anticuerpos 2° conjugados con peroxidasa de rábano. Finalmente los cortes se revelarán con 3,3-diaminobenzidina y colorearán con hematoxilina. La visualización se realizará por microscopia óptica. Además se evaluación de senescencia y apoptosis por el método de TUNEL en cortes de estos tejidos.

RESULTADOS:

Histamina previene la disfunción de las glándula submaxilar irradiadas

Para evaluar la funcionalidad del órgano se construyeron curvas dosis respuesta (CDR), en ratas anestesiadas a través de la canulación de los conductos de las Glándulas Submaxilares (GSMs) y la inducción de la secreción salival por la inyección a través de la vena femoral de metacolina (0.3, 1, 3 y 10 mg/kg). Los resultados son expresados en mg de saliva. **Tabla 1 y 2. Figura 1.**

MC (µg/kg)	No tratado	Histamina	No tratado-5Gy	Histamina-5Gy
1	7,0±1,0	5,5±0,1	5,0±1,5	7,8±0,3
3	15,5±1,5	20,5±3,0	13,8±3,3	21,5±3,0
10	53,0±0,1	45,0±1,5	32,0±5,0 **	64,8±6,3###
30	92,0±1,0	81,0±7,0	60,0±0,1 *	91,3±10,8#

Tabla 1. La histamina previene el daño producido por la RI sobre la funcionalidad de la glándula salival. La histamina preserva significativamente la secreción salival. Los datos representan la media ± ESM. **P<0.01, *P<0.05 vs. no tratado, ###P<0.001, #P<0.05 vs. no tratado-5Gy.

Grupo	Peso de GSM ¶
No tratado	0.36±0.03
Histamina	0.33±0.01
No tratado-5Gy	0.22±0.03*
Histamina-5Gy	0.34±0.01#

Tabla 2. Porcentaje de GSM respecto del peso corporal (el peso húmedo de la GSM se divide por el peso corporal en gramos y se multiplica por 100). Los datos representan la media ± ESM. *P<0.05 vs. no tratado; #P<0.05 vs. No tratado-5Gy.

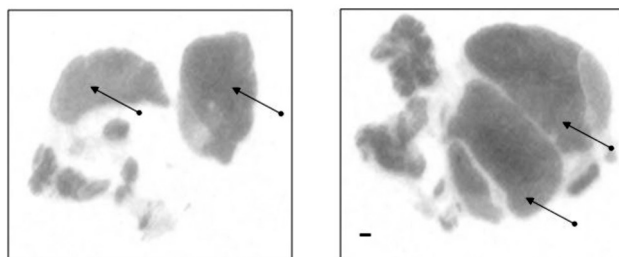


Figura 1. La vista macroscópica de un corte histológico coloreado con hematoxilina-eosina demuestra una pérdida significativa del área de la superficie glandular en la GSM (flechas) de ratas irradiadas **a)** mientras que el tratamiento con histamina la conserva significativamente **b)**. Barra de escala= 100 □ m.

Contenido intracelular de histamina en GSM de rata. Se encuentra un elevado contenido intracelular de histamina en células ductales de GSM. **Figura 2.**

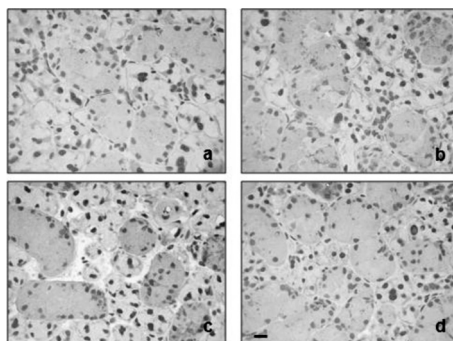


Figura 2. Contenido intracelular de histamina en GSM de rata. a) no tratada, b) tratada con histamina, c) irradiada, d) irradiada y tratada con histamina. Aumento 630x. Barra de escala= 20 µm

Expresión de HDC en GSM de rata. Se observa un alto nivel de expresión de HDC principalmente en células de los ductos excretores de GSM de animales. **Figura 3.**

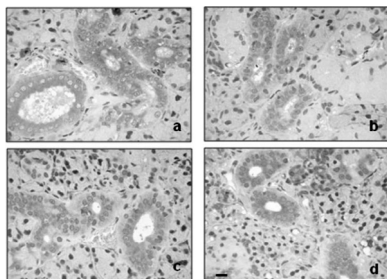


Figura 3. Expresión de HDC en GSM de rata. a) no tratados, b) tratados con histamina, c) irradiados, d) irradiados y tratados con histamina. Aumento 630x. Barra de escala= 20 μ m.

La histamina previene el daño producido por la RI sobre la morfología de la glándula salival. Figura 4.

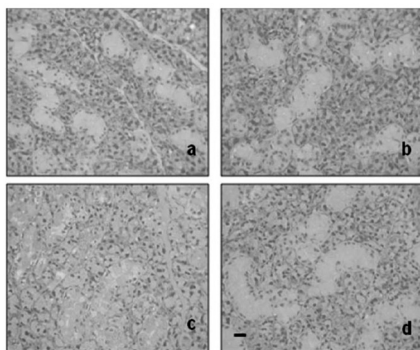


Figura 4. Morfología de la glándula salival. Apariencia histológica normal de GSM a) no tratada y b) tratada con histamina, c) GSM de ratas irradiadas exhibiendo una alteración en la arquitectura del epitelio con pérdida del material secretor, d) GSM de animales irradiados y tratados con histamina mostrando preservación de la organización estructural, apariencia normal de los conductos contorneados granulares. Aumento 630x. Barra de escala= 20 μ m.

Histamina incrementa la expresión de PCNA y inhibe la apoptosis en glándulas submaxilares irradiadas

La histamina aumenta la expresión de PCNA y disminuye la apoptosis en la GSM irradiada. Figura 5-9.

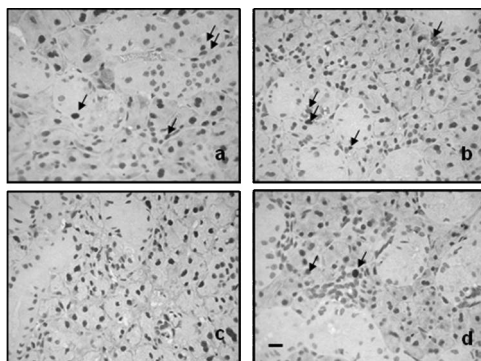


Figura 5. PCNA en la GSM. Similar inmunoreactividad de PCNA en GSM de ratas a) no tratadas y b) tratadas con histamina. c) Ausencia de inmunoreactividad para PCNA en la glándula irradiada. d) Preservación parcial del número de células PCNA-positivas en la glándula irradiada y tratada con histamina. Las flechas indican células PCNA-positivas. Aumento 630x. Barra de escala= 20.

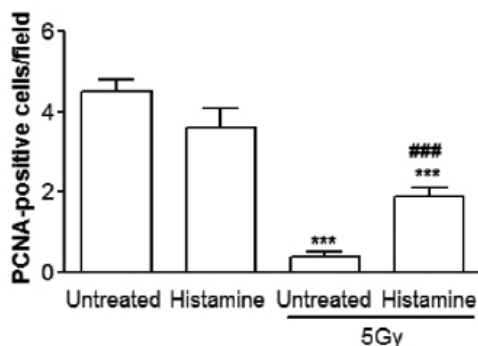


Figura 6. La histamina aumenta la expresión de PCNA en la GSM irradiada. La RI disminuye significativamente el número de células PCNA-positivas mientras que la histamina revierte en parte el efecto inhibitorio de la RI sobre la expresión de PCNA. Las barras representan la media $\pm$ ESM. *** $P < 0.001$ vs. no tratado, ### $P < 0.001$ vs. no tratado-5Gy. mm.

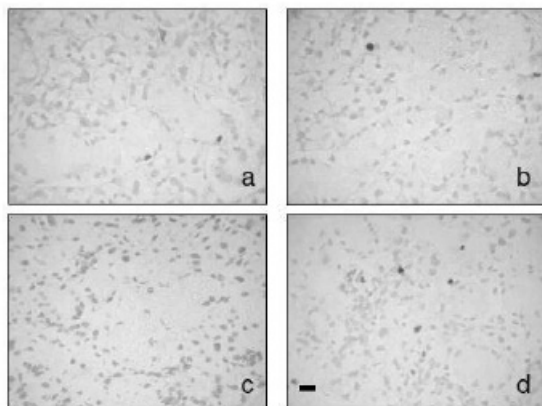


Figura 7. La histamina inhibe la apoptosis inducida por la RI en la GSM. Escasas células TUNEL-positivas en los conductos granulares de animales a) no tratados b) y tratados con histamina. c) Apoptosis masiva tanto en células ductales y acinares de la glándula de ratas irradiadas. d) Dramática reducción de la apoptosis en GSM de animales irradiados y tratados con histamina. Aumento 630x. Barra de escala= 20 μ m.

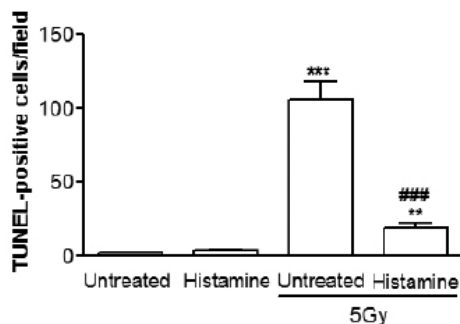


Figura 8. La histamina inhibe la apoptosis inducida por la RI en la GSM. La RI aumenta significativamente el número de células TUNEL-positivas mientras que la histamina revierte en parte el efecto apoptótico de la radiación. Las barras representan la media $\pm$ ESM. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ vs. no tratado, ### $P < 0.001$ vs. no tratado-5Gy.

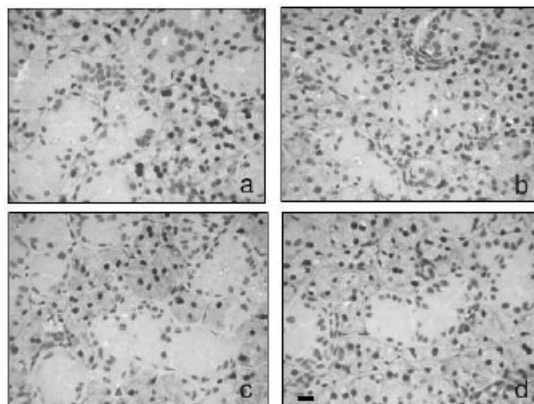


Figura 9. La histamina reduce la inmunoreactividad de la proteína pro-apoptótica Bax inducida por la RI. Mínima expresión de Bax en glándulas de animales a) no tratados b) y tratados con histamina. c) Expresión aumentada de Bax principalmente en los acinos de glándulas de animales irradiados. d) Reducida inmunoreactividad de Bax en glándulas de ratas irradiadas y tratadas con histamina. Aumento 630x. Barra de escala= 20 μ m.

La irradiación potencia el daño óseo producido por la enfermedad periodontal.

Las fotos muestran las imágenes macroscópicas, obtenidas de las mandíbulas de animales a los cuales se le indujo la enfermedad periodontal mediante un hilo de algodón en su primer molar y luego se los irradia según corresponda al grupo. Los datos de la resorción ósea se evaluaron a través de la determinación mediante un calibre de la distancias entre la cresta y la línea amelo cementar. Figura 10.

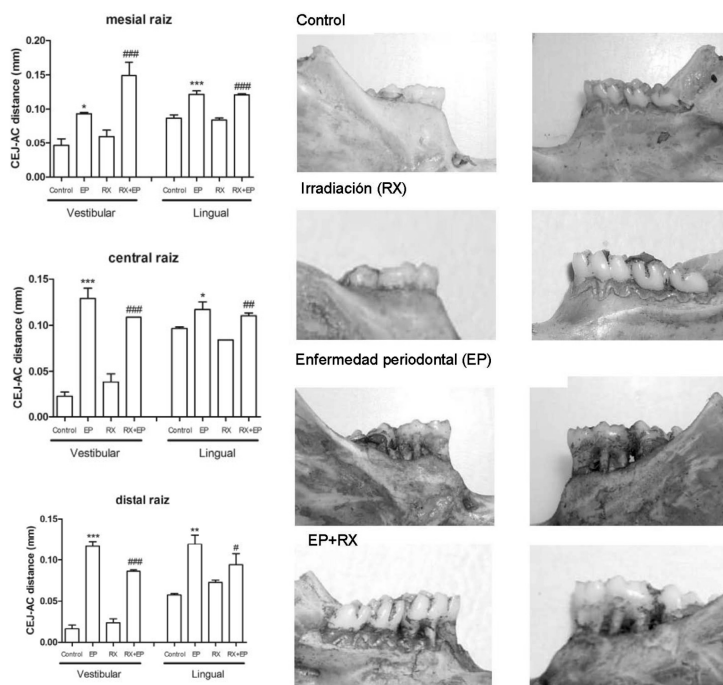


Figura 10. La histamina previene el daño producido por la EP sobre la funcionalidad de la glándula salival. Histamina preserva significativamente la secreción salival. Los datos representan la media $\pm$ ESM. *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$ vs. no tratado, # $P < 0.05$ vs. EP.

La histamina previene la disfunción de las glándulas submaxilares con enfermedad periodontal

La Histamina conserva el peso de la GSM en las ratas que presentan EP. Tabla 3.

Group	SMG weight a
Untreated	0.76 ± 0.01
Periodontal disease	0.89 ± 0.02*
Periodontal disease - Histamine	0.79 ± 0.05
Histamine	0.77 ± 0.03

Tabla 3. Porcentaje de GSM respecto del peso corporal (el peso húmedo de la GSM se divide por el peso corporal en gramos y se multiplica por 100). Los datos representan la media ± ESM. *P<0.05 vs. no tratado.

La histamina previene el daño producido por la EP sobre la morfología de la glándula salival. Figura 11.

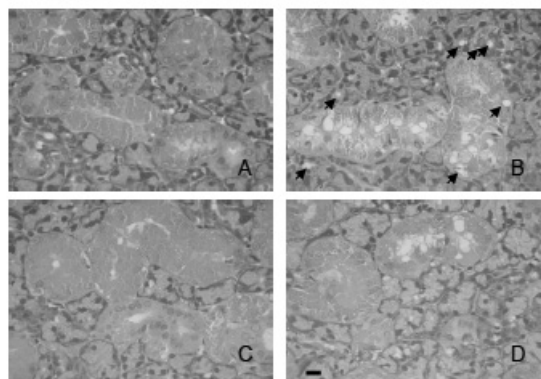


Figura 11. Apariencia histológica normal de GSM (A) y (B) tratada con histamina. C) GSM de ratas a las que se le indujo enfermedad periodontal (EP) presentan una alteración en la arquitectura del epitelio con pérdida del material secretor. D) GSM de animales con EP y tratados con histamina mostrando preservación de la organización estructural, apariencia normal de los conductos contorneados granulares. Aumento 630x. Barra de escala= 20 µm.

Histamina incrementa la expresión de PCNA y inhibe la apoptosis en glándulas submaxilares de animales a los que se le indujo enfermedad periodontal. Figura 12-13. Tabla 4.

Group	PCNA-positive cells/field	TUNEL-positive cells/field
Control	4.2 ± 0.8	0.3 ± 0.2
Experimental periodontitis	0.2 ± 0.1***	60.9 ± 4.6***
Histamine-experimental periodontitis	2.2 ± 0.3**##	1.0 ± 0.4###
Histamine	3.6 ± 0.4	0.4 ± 0.2

Tabla 4. La histamina inhibe la apoptosis inducida por la enfermedad periodontal en la GSM. La enfermedad periodontal aumenta significativamente el número de células TUNEL-positivas mientras que la histamina revierte en parte el efecto apoptótico de la enfermedad periodontal. Las barras representan la media ± ESM. ***P<0.001, **P<0.01 vs. no tratado, ###P<0.001 vs. no tratado-enfermedad periodontal. **La histamina aumenta la expresión de PCNA en la GSM enfermedad periodontal.** La enfermedad periodontal disminuye significativamente el número de células PCNA-positivas mientras que la histamina revierte en parte el efecto inhibitorio de la RI sobre la expresión de PCNA. Las barras representan la media ± ESM. ***P<0.001 vs. no tratado, ###P<0.001 vs. no tratado- enfermedad periodontal.

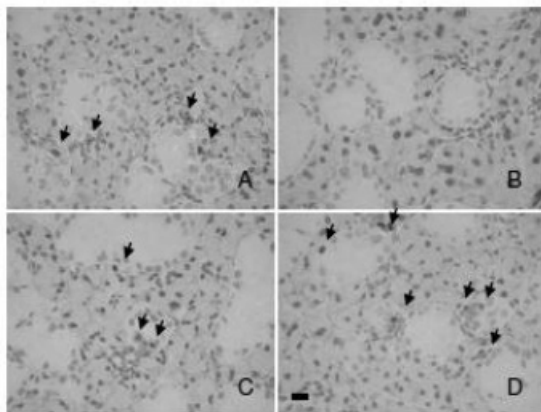


Figura 12. La histamina restablece la proliferación celular inhibida por la EP en la GSM. La EP disminuye significativamente el número de células PCNA-positivas, mientras que la histamina revierte en parte el efecto inhibitorio de la EP sobre la expresión de células PCNA positivas. Aumento 630x. Barra de escala= 20 µm.

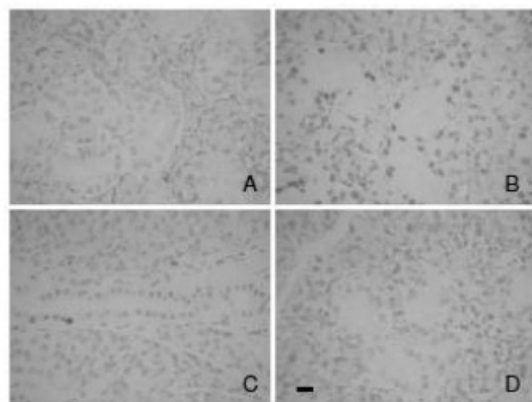


Figura 13. La histamina inhibe la apoptosis inducida por la EP en la GSM. Escasas células TUNEL-positivas en los conductos granulares de animales a) no tratados b) y tratados con histamina. c) Apoptosis masiva tanto en células ductales y acinares de la glándula de ratas con EP. d) Dramática reducción de la apoptosis en GSM de animales con EP y tratados con histamina. Aumento 630x. Barra de escala= 20 μ m.

CONCLUSIÓN

El tratamiento de los tumores por medio de la radiación ionizante, es la terapéutica de primera elección para los tumores malignos de cabeza y cuello. La radiación actúa sobre la célula tumoral inhibiendo su crecimiento, proliferación y provocando finalmente su muerte. Desafortunadamente, las células normales cercanas a las células tumorales, también son afectadas y es de vital importancia encontrar nuevos abordaje farmacológico para proteger las células normales y de esta manera la funcionalidad del tejido. Los resultados obtenidos a partir del desarrollo de este proyecto contribuyeron a identificar el rol de la histamina como radioprotector de la glándula submaxilar frente a los efectos adversos producidos por la radioterapia. Además, se demostró el beneficio que pueden generar sobre la salud bucal y la hiposalia producida por la irradiación que es una de las principales reacciones deletéreas que se producen. Los resultados obtenidos sugieren el uso de la histamina como radioprotector en el tratamiento de patologías de alta incidencia y de gran impacto sobre la salud humana y por eso consideramos muy relevante los

resultados obtenidos y que se han publicado en revistas internacionales y presentado en congresos internacionales durante el desarrollo del proyecto subsidiado por la fundación.¹⁵

RESUMEN

La radioterapia, desde hace muchos años constituye una importante alternativa terapéutica para el tratamiento del cáncer. Aunque efectiva, la terapia por radiación ionizante no es específica y puede dar lugar a numerosos efectos colaterales. Una de las claves para la eficacia de la radioterapia es lograr un efecto selectivo produciendo el máximo de daño a las células tumorales sin afectar los tejidos normales del paciente. La manipulación previa de la respuesta biológica tanto del tejido blanco como del entorno puede proporcionar beneficios terapéuticos. De esta manera un abordaje farmacológico, como el empleo de agentes radiosensibilizantes o radioprotectores, puede incrementar la sensibilidad del tumor a la radiación o disminuir los efectos deletéreos sobre los tejidos normales. En el caso del tratamiento con radioterapia en cáncer de cabeza y cuello, las complicaciones orales son el efecto adverso más significativo. Estas alteraciones se expresan como lesión primaria de los tejidos orales y la pérdida total o parcial de la secreción salival de esta manera se dificulta la administración de protocolos terapéuticos, comprometiendo tanto la supervivencia como calidad de vida del paciente. Recientemente, se han descrito los efectos beneficiosos que tiene la histamina sobre el trato gastrointestinal en animales tratados con radioterapia, indicándola como un potencial agente terapéutico en aquellos pacientes que reciban radioterapia. Por lo que nuestro objetivo es investigar la capacidad de la histamina de modificar los efectos indeseados de la respuesta a la radiación ionizante sobre los tejidos orales, la funcionalidad de la glándula submandibular y su relación con la enfermedad periodontal.

Palabras Claves: histamina, radiación ionizante, radioprotección, secreción salival, glándula submaxilar, apoptosis.

Los resultados de este proyecto fueron publicados en los siguientes artículos:

- Histamine modulates salivary secretion and diminishes the progression of periodontal disease in rat experimental periodontitis. Prestifilippo JP, Carabajal E, Croci M, Fernández-Solari J, Rivera ES, Elverdin JC, Medina VA. *Inflamm Res*. 2012 Jan 20.

- Histamine prevents functional and morphological alterations of submandibular glands induced by ionising radiation. Medina VA, Prestifilippo JP, Croci M, Carabajal E, Bergoc RM, Elverdin JC, Rivera ES. *Int J Radiat Biol.* 2011 Mar;87(3):284-92. Epub 2010 Dec 10.



ROL DEL ONCOGÉN K-RAS EN LA CARCINOGENESIS BUCAL

Álvarez R., Abrigo M., Calb D., Raimondi Ana R.

Área de Investigación Instituto de Oncología Ángel H. Roffo. Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

INTRODUCCIÓN

El carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC) se produce en la cavidad bucal, la orofaringe, laringe o hipofaringe, siendo la sexta causa de cáncer

a nivel mundial debido a su incidencia (1). A pesar de los avances obtenidos en el estudio del proceso carcinogénico, la prevención y el tratamiento del CCECC, la tasa de sobrevida luego del diagnóstico aun es baja siendo menor al 50%, la cual es menor a la reportada para cáncer de mama, cérvix y cáncer colorrectal (1, 2). La limitada sobrevida se debe en parte a que gran cantidad de los pacientes concurren a la consulta en un estadio avanzado de la enfermedad lo cual refleja la ausencia de diagnóstico temprano por falta de marcadores adecuados, y también a la falla en la respuesta a los tratamientos quimioterápicos disponibles. Tres cuartas partes de los CCECC provienen de países en vías de desarrollo (3, 4). En la República Argentina este tipo de cáncer es frecuente y al igual que en América Latina y ciertas regiones de Europa y USA representa importantes problemas de salud pública asociados a la pobre calidad de vida de los pacientes. En el caso del carcinoma de células escamosas bucal (CCEB) este representa más del 95% de los cánceres de la cavidad bucal (3).

El mecanismo exacto por el cual estos agentes carcinogénicos inducen transformación y progresión maligna de un epitelio escamoso como el de la cavidad bucal aun hoy no es completamente entendido. Trabajos pioneros en este campo han demostrado, en lesiones pre-invasivas y benignas de cáncer bucal de individuos consumidores de tabaco, una pérdida cromosomal progresiva relativa a la gravedad de las lesiones estudiadas (4). La expresión del receptor del EGF (EGFR) esta amplificada en el CCEB y se ha sugerido como un factor predictivo de comportamiento biológico agresivo (2). La

sobre-expresión del EGFR se asocia a la activación de la cascada de señal de Ras/MAPK y PI3-K (1, 2). En particular en cánceres bucales el oncogén *ras* ha sido reportado mutado (1, 2, (5)). Los avances en el análisis de la tumorigénesis bucal han sido muy lentos debido a la limitada disponibilidad de modelos animales adecuados para la investigación de este tipo de cáncer. Por ello hemos generado y validado un novedoso modelo murino transgénico K14-CreER^{TAM}/K-*ras*^{G12D} que presenta un adecuado desarrollo de lesiones premalignas específicamente en la mucosa bucal (5). Los ratones transgénicos K14-CreER^{TAM}/K-*ras*^{G12D} presentan la expresión de *ras* activado (mutación G12D), y producen lesiones benignas como papilomas bucales e hiperplasias en la lengua (6).

En este trabajo describimos el efecto de la activación del oncogén *ras* sobre las etapas tempranas de la cancerización bucal en el mencionado modelo. Se analizó el estado proliferativo y de diferenciación de las lesiones premalignas y se estudió el mecanismo por el cual K-*ras*^{G12D} lleva a la mucosa oral a presentar las alteraciones mencionadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron utilizando el ratón transgénicos K14-CreER^{TAM}/LSL-K-*ras*^{G12D} así como los correspondientes ratones *wild type*. Para la identificación de los animales dobles transgénicos a los 21 días de vida de las crías se obtuvieron biopsias de las colas, de las cuales se purificó ADN para el genotipado por PCR utilizando primers específicos para cada una de las líneas. Una vez identificados los animales dobles transgénicos a los 30 días de edad se realizó la inducción del transgén por tratamiento con tamoxifeno por vía oral con una dosis de 1mg/ ratón /día durante 5 días (6). A partir de allí se monitoreó la evolución de los animales hasta la aparición de lesiones bucales. Se tomaron muestras de las lesiones. Se realizaron técnicas de rutina histológica (H-E) para constatar la naturaleza histológica de las lesiones.

Imunohistoquímica y Western blot

Se utilizaron cortes de 5 μ m de espesor del material fijado en formol al 10%, montados en portaobjetos silanizados. Se realizó un protocolo estándar para reacciones inmunohistoquímicas (7). Se realizó recuperación antigénica y como sistema de revelado se utilizó avidina-biotina y peroxidasa (Vector Stain Elite, ABC kit, Vector). Anticuerpos PCNA, CK14 (Zymed, Babco), p16 y

KLF4 (Santa Cruz biotechnology). Para realizar western blot se utilizaran lisados totales de muestras representativas de las lesiones mencionadas mantenidas a -80°C . Se determinó la cantidad de proteínas totales según técnica estándar (DC Protein Assay, BioRad) para utilizar 50ug totales de proteínas y separarlas por SDS-PAGE, transferencia a membrana de nitrocelulosa y bloqueo con BSA 5%. Todas las determinaciones se realizarán respecto de controles y se utilizarán controles de carga estándar (actina).

Actividad de b-galactosidasa endógena

Se realizó la determinación histoquímica de la actividad de b-galactosidasa endógena a pH 6 asociada a senescencia (SA- β gal) en cortes de crióstato fijados por congelación e incluidos en OCT (Cell Signaling Kit, Cell signaling Technology, MA).

Microarray de ADNc

Realizamos microarrays utilizando la plataforma de trabajo de Agilent Technologies (array slide: 4x44K Agilent, Mouse). Control: mucosa bucal '*Wild Type*'. Caracterizamos 4 papilomas respecto de sus tejidos control (N=4). Extracción de ARNm total (Rneasy Mini kit, Qiagen). Síntesis de ADNc; amplificación y marcado; purificación (Quick Amp Labelling kit, two-color. Agilent Technology). Referencia: Universal Mouse Reference RNA (Stratagene). Escaneado de array slides, Agilent ADN Microarray Scanner. La confección y realización de los microarray se llevo a cabo en el laboratorio del Dr. Gutkind (NIDCR, NIH, USA). En Buenos Aires se realizó la cuantificación, estadística (Agilent Feature Extraction software v 9.5; GeneSpring GX11) y validación del *array*.

RESULTADOS

Las lesiones que desarrollan los ratones K14-CreER^{TAM}/K-ras^{G12D} en la cavidad bucal son papilomas escamosos con hiperqueratosis y en la lengua desarrollan cuadros hiperplásicos con zonas de acantosis, papilomatosis e hiperqueratosis (figura 1). Estos papilomas presentan un aumento de la proliferación celular, restringida a la capa basal, pudiéndose evidenciar también la expresión de un marcador de diferenciación epitelial como la filagrina en las capas suprabasales (6).

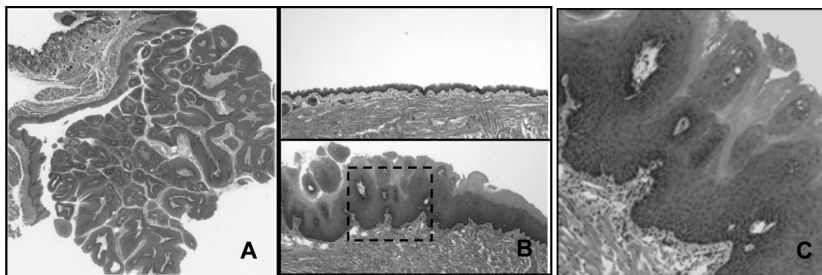


Figura 1. Fenotipo de las lesiones producidas en el modelo murino transgénico K14-CreERT^{TAM} /K-ras^{G12D}. A. Microscopía de papiloma escamoso desarrollado en la cavidad bucal. B. Epitelio de lengua Wild Type y zona hiperplásica de una lengua de ratón K-rasG12D. C. Detalle de la microscopía de B.

El patrón de proliferación celular en las lenguas de los ratones transgénicos, mostró que las capas basales de las hiperplasias fueron PCNA positivas sin llegar a presentar diferencias estadísticamente significativas con los controles mientras que la expresión de citoqueratina 14 se observó en la capa suprabasal difiriendo de la lengua normal (figura 2). Así mismo analizamos la actividad de beta-galactosidasa asociada a senescencia, encontrando que las hiperplasias y los papilomas eran negativos y no observando figuras apoptóticas en localizaciones anómalas para las hiperplasias de lengua, por análisis con hematoxilina-eosina (figura 2). Hemos logrado caracterizar en detalle que en

nuestro modelo, la activación de K-Ras en la mucosa bucal, produce un aumento de la proliferación celular y que se comienzan a observar anomalías en el patrón de expresión de citoqueratinas y marcadores de diferenciación que difieren según su localización en la cavidad bucal. Además dado que los niveles de expresión de la proteína ras mutada son fisiológicos no se producen zonas senescentes en las lesiones bucales y de lengua.

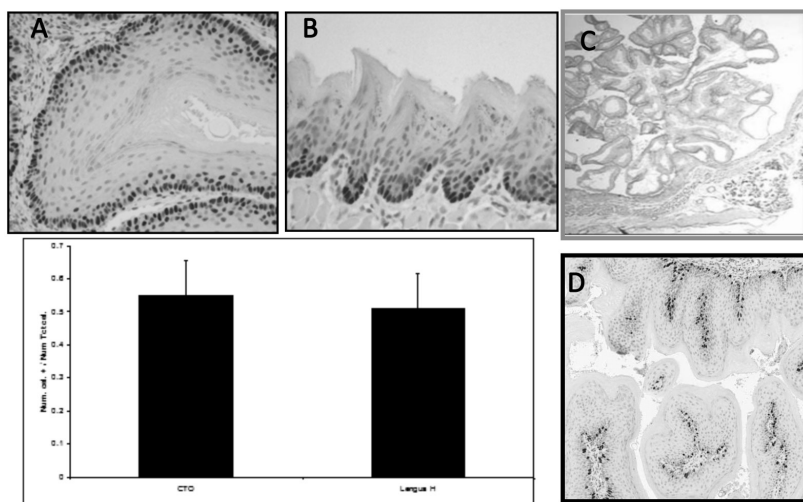


Figura 2. Patron de expresion inmunohistoquímica de citoqueratina 14 para un papiloma A. y lengua con hiperplasia B. provenientes de ratones K14-CreER^{TAM}/K-ras^{G12D}. C. Reacción de b-galactosidasa endógena para un papiloma. La βgal. fue negativa y se encontró reacción positiva, color azul (control interno) de las glándulas salivales. D. La figura presenta la reacción inmunohistoquímica para BrdU, indicador de proliferación celular. Todas las capas basales del papiloma son positivas para la BrdU. El gráfico de barras corresponde a la cuantificación de la reacción inmunohistoquímica para PCNA, en lesiones hiperpásicas de lengua (Lengua H, N= 5) de los animales K14-CreER^{TAM}/LSL-K-ras^{G12D} versus lenguas Wild Type (CTO, N= 5). Se ha cuantificado el número de células con marca positiva sobre el total de células del área elegida (magnificación 40X), En promedio se utilizaron 5 campos por cada área elegida. Se utilizo el software Image-Pro Plus 5.1. No hay diferencias significativas entre los grupos.

En cuanto al mecanismo por el cual, en nuestro modelo, K-rasG12D lleva a la mucosa oral a presentar lesiones benignas ya habíamos analizamos la vía de señal Ras/MAPK no encontrando activación de MAPK y describimos sobre-expresión de DUSP-14, fosfatasa de map quinasas, en las lesiones y por otra parte encontramos acumulación de pS6 blanco final de la vía Akt/mTOR (6). La utilizacion del inhibidor específico de mTOR, rapamacina, previno la progresión de las lesiones benignas desarrolladas en nuestro ratones. Para seguir explorando el proceso carcinogénico que produce las lesiones y buscar posibles nuevos mecanismos relacionados con K-Ras en la tumorigenesis

bucal exploramos, a través de la técnica de *microarrays* de ADNc, la expresión diferencial de moléculas asociadas estas lesiones. El análisis de los resultados reveló la activación de distintas vías de señal, algunas relacionadas con la vía de las MAP quinasas y otras no vinculadas con las misma. Caracterizamos los papilomas respecto de sus tejidos control. Luego de realizar un ANOVA (Multiple Testing Correction: Benjamin-Hochberg) con $p < 0.02$ se observó una expresión diferencial para 1591 genes. Al realizar un 'Análisis de Cluster Jerárquico No Supervisado' sobre el patrón de expresión de genes obtenido identificamos clusters bien definidos y el grupo control se distanció claramente de los papilomas. Con el objeto de analizar en detalle las posibles vías de señal activadas en estos clusters realizamos un "análisis de enriquecimiento de grupos de genes" (GSEA) sobre nuestros datos. Es de destacar que el grupo papiloma versus el grupo control presentó una gran cantidad de grupos de genes expresados diferencialmente ($N=31$) valor $q < 0.01$ (análisis presentados *in extenso* en la Jornadas Nacionales de Oncología del Inst. Angel H. Roffo, 2010). Entre estos grupos se destacaron citoqueratinas de alto peso molecular, ciclina D1, p16, p21 y factores de transcripción como los pertenecientes a la familia KLF y p53. Es de destacar que la expresión de los grupos de genes en los papilomas reveló cambios tempranos en moléculas vinculadas a los procesos normales de diferenciación y proliferación celular (tabla 1).

Sabiendo que estas lesiones son hiperproliferantes en una primera instancia buscamos validar la expresión de p16, un conocido gen supresor de tumor afectado tempranamente en la cavidad bucal. Los papilomas aún expresan p16 también a nivel proteico y en coincidencia con el resultado del array. La expresión de p16 es coherente con la descripción y análisis a nivel proliferativo y de diferenciación que hemos presentado en la primer parte de este trabajo.

Tanto los papilomas bucales como las hiperplasias en la lengua son lesiones benignas sin capacidad de transformarse a menos que existan mutaciones adicionales que afectan el control del ciclo celular o la homeostasis del tejido en su conjunto. Ya hemos publicado resultados al respecto relacionados con el control del ciclo celular, cuando criamos los ratones K14-CreER^{TAM} /K-ras^{G12D} con ratones *knockout* condicionales p53^{flox/flox} los animales transgénicos resultantes desarrollan carcinomas de lengua (6). Demostramos así que p53 coopera con *ras* en la carcinogénesis bucal, específicamente en la lengua.

Papiloma vs. Control	Genes totales	Genes encontrados	Valor de q	ES	Genes relevantes
LEE_MYC_TGFA_DN	66	53	0.034	0.617	KLF15
MORF_PRKACA	112	94	0.084	0.400	KRT33A
DIAB_NEPH_UP	62	54	0.086	0.450	CCND1
GATAAGR_VGATA_C	304	224	0.089	0.409	KLF1 KRT15 KRT20 KRT23
MITOCHONDRIA	447	371	0.091	0.518	CDKN2A (p16) CDKN1A (p21) TP53 (p53) CDKN1C (p57) KRT18
LEE_DENA_DN	74	64	0.088	0.500	KRT4
VPPARA_01	37	29	0.092	0.456	KLF

Tabla 1. Análisis de enriquecimiento de genes. Sets de genes analizados por GSEA. ES: enrichment score (estadístico generado por el análisis de GSEA, mide el solapamiento entre 2 grupos de genes). Se utilizó la Molecular Signatures database (MsigDB; <http://www.broad.mit.edu/gsea/msigdb>) contiene 5 categorías: Positional gene sets, Curated gene sets, Motif gene sets, Computacional gene sets, Gene ontology gene. En rojo se destacan las moléculas de interés.

Y finalmente dado que relacionados con p53, p21 y p16 existen factores de transcripción responsables del control de la proliferación y/o diferenciación de distintos linajes celulares como los que pertenecen a la familia de los factores tipo Krüppel (KLF: *Krüppel like factor*) (8) decidimos buscar la expresión de algún miembro de la familia de los KLF en los papilomas escamosos. Algunos se asocian a la normal maduración de tejidos epiteliales (9, 10), en particular, KLF4 es un factor de transcripción que se expresa en tejidos epiteliales y los patrones de expresión del mismo tanto “*in vitro*” como “*in vivo*” se corresponden con el control del arresto del ciclo celular (9). Comenzamos analizando

KLF4 y encontramos su expresión a nivel proteico en papilomas así como en 2 líneas celulares (HN13, proveniente de una lesión premaligna de cavidad bucal y HN12, ganglio con metástasis de cabeza y cuello) (figura 3).

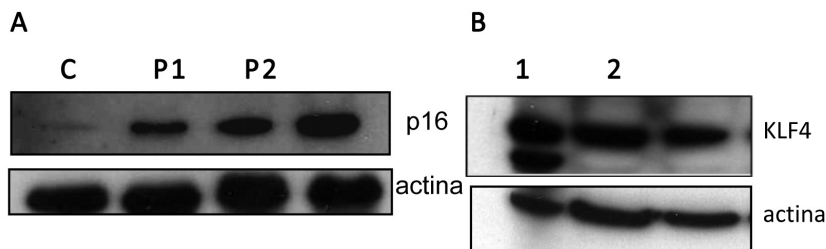


Figura 3. A.) Western blot representativo de la expresión de p16 en papilomas del ratón K14-CreER^{TAM}/K-ras^{G12D}, P1 al P3, en comparación con mucosa control, C. B.) Western blot representativo de la expresión de KLF4 en papiloma bucal (1) desarrollados en ratón K14-CreER^{TAM}/K-ras^{G12D} en comparación con la expresión en células HN13 y HN12 (2 y3).

CONCLUSIONES

Hemos logrado caracterizar las lesiones preneoplásicas desencadenadas por la activación del oncogen K-Ras lo cual nos permite saber con exactitud las características de nuestro modelo murino transgénico y poder explorar los mecanismos por los cuales se producen las mismas y en adelante comenzar a buscar correlatos con las lesiones preneoplásicas de la cavidad bucal humana. Ya conociendo la naturaleza proliferante de los papilomas escamosos bucales describimos, en el contexto de este trabajo, a nivel proliferativo y de diferenciación las hiperplasias de la lengua. Podemos concluir que K-Ras produce un aumento de la proliferación y aún se mantiene la diferenciación celular si bien se comienzan a observar anomalías en el patrón de expresión de las citoqueratinas. Hasta el momento podemos afirmar que nuestro sistema de queratina 14, tejido específico, junto al sistema *Knock in* para Ras, logra producir niveles endógenos de la proteína Ras mutada y genera alteraciones de la proliferación que difieren entre la mucosa bucal y la lengua, haciéndolas equiparables a los eventos iniciales de la tumorigénesis bucal humana, dado que la incidencia y evolución de las lesiones premalignas bucales difiere de acuerdo a su localización anatómica. Y finalmente, sabien-

do que los niveles de expresión de la proteína Ras mutada son fisiológicos constatamos que no se producen zonas senescentes en las lesiones bucales y de lengua. Respecto al estudio del mecanismo por el cual se producen las lesiones y conociendo que el desarrollo de las mismas es en parte dependiente de mTOR, dado nuestros trabajos previos, en este caso analizamos nuevas casacadas de señal vinculadas o no a K-Ras. Del análisis de un *microarray* sobre los papilomas bucales surgen nuevas preguntas y moléculas de interés para entender los eventos tempranos de la carcinogénesis oral. Entre ellos se destaca la expresión, en papilomas, del factor de transcripción KLF4, recordando que las lesiones son desencadenadas por la activación de K-Ras. KLF4 ha sido relacionado con la carcinogénesis de colon y esófago cumpliendo en esos cánceres un rol de gen supresor de tumor. Estos resultados finales reflejarían algún rol para KLF4 en el mantenimiento de las lesiones benignas, que como hemos demostrado son proliferantes y bien diferenciadas. Es de destacar que aún hoy se carece de reales marcadores de diagnóstico temprano para la cavidad bucal y que el entendimiento detallado del inicio y desarrollo de este tipo de cáncer es de relevancia dado las dificultades que se presentan una vez avanzada la enfermedad como bien hemos detallado en la introducción de este trabajo. Estos datos aseguran que debemos profundizar y continuar trabajando sobre esta familia de factores de transcripción, generando nuevas preguntas sobre el rol concreto que cumplirían junta a K-Ras en las eventos iniciales de la carcinogénesis bucal.

ABSTRACT

Head and neck cancer is among the most prevalent cancers in the world; despite improvements in treatment survival has not changed over the past 30 years. A major limitation in this area of research has been the limited availability of animal models to test the validity of current genetic paradigms of tumorigenesis, and to explore the effectiveness of treatment modalities or chemopreventive strategies. We have developed an inducible oral-specific animal tumor model system enabling the study of K-ras induced transformation in the oral cavity. This system consists in the expression of a tamoxifen-inducible Cre recombinase (CreER^{TAM}) under the control of the cytokeratin 14 (K14) promoter (K14-CreER^{TAM} mice) and the mice LSL-K-ras^{G12D}. Upon ras activation the mice developed papillomas exclusively in the oral mucosa and the tongues showed a marked hyperplasia with significant acanthosis, papillomatosis and hyperkeratosis. We found increased cell proliferation, restricted to the basal layers, in the papillomas as well as in the tongues. However the

hyperplastic tongues did not show a statistically significant differences with the control tongues. K14 was expressed poorly in the basal layer but strongly in the upper layers of the papillomas and tongues of the transgenic mice. We have studied the activity of the endogenous β -galactosidase and we did not find activity in the papillomas and tongues. These lesions were not senescent and were highly proliferative and well differentiated. Indeed, these papillomas retained the expression of the tumor suppressor gene p16 and did not harbor p53 mutations. Interestingly, we have observed a distinct susceptibility of tumor progression between the tongue and the oral mucosa. We have performed a cDNA microarray analysis with the premalignant lesions. We have found a set of molecules differentially expressed in papillomas versus control tissues. Among the molecules that were found in the array analysis appears a group of transcription factors related to the control of cellular proliferation and differentiation that belongs to the KLF family. We have found expression of KLF4 protein in the papillomas. Finally, this model showed increased cell proliferation that was coupled with cell differentiation. The K14Cre-ER^{TAM}/LSL-K-ras^{G12D} animal model system have presented early oral cancer lesions and represent a suitable platform for exploring the underlying molecular mechanism upon *ras* activation.

BIBLIOGRAFIA

1. Leemans, C.R., Braakhuis, B.J. and Brakenhoff, R.H. The molecular biology of head and neck cancer, *Nat.Rev.Cancer*, 11: 9-22, 2011.
2. Jemal, A., Center, M.M., Desantis, C. and Ward, E.M. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends, *Cancer Epidemiol.Bio-markers Prev.*, 19: 1893-1907, 2010.
3. Nagpal, J.K. and Das, B.R. Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management, *Oral Oncol.*, 39: 213-221, 2003.
4. Warnakulasuriya, S. Significant oral cancer risk associated with low socioeconomic status, *Evid.Based.Dent.*, 10: 4-5, 2009.
5. Mao, L., Hong, W.K. and Papadimitrakopoulou, V.A. Focus on head and neck cancer, *Cancer Cell*, 5: 311-316, 2004.
6. Raimondi, A.R., Molinolo, A. and Gutkind, J.S. Rapamycin prevents early onset of tumorigenesis in an oral-specific K-ras and p53 two-hit carcinogenesis model, *Cancer Res.*, 69: 4159-4166, 2009.

7. Raimondi,A.R., Vitale-Cross,L., Amornphimoltham,P., Gutkind,J.S. and Molinolo,A. Rapid development of salivary gland carcinomas upon conditional expression of K-ras driven by the cytokeratin 5 promoter, *Am.J.Pathol.*, 168: 1654-1665, 2006.
8. Wei,D., Kanai,M., Huang,S. and Xie,K. Emerging role of KLF4 in human gastrointestinal cancer, *Carcinogenesis*, 27: 23-31, 2006.
9. Evans,P.M. and Liu,C. Roles of Krupel-like factor 4 in normal homeostasis, cancer and stem cells, *Acta Biochim.Biophys.Sin.(Shanghai)*, 40: 554-564, 2008.
10. Segre,J.A., Bauer,C. and Fuchs,E. Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin, *Nat.Genet.*, 22: 356-360, 1999.



DESARROLLO DE UN NUEVO TRATAMIENTO PARA LA OSTEOPOROSIS. COMBINACIÓN DEL CONTROL METABÓLICO DE LA REMODELACIÓN ÓSEA CON DROGAS OSTEOGÉNICAS Y ANTIRRESORTIVAS

María L Brance, Lucas RM Brun, Maela Lupo, Hilda S Moreno, Alfredo Rigalli
Laboratorio de Biología Ósea. Facultad de Ciencias Médicas.
Universidad Nacional de Rosario.

INTRODUCCIÓN

La pérdida de masa ósea que conduce a osteoporosis es un serio problema de salud pública. Los tratamientos utilizados se encuentran en etapa de desarrollo y los mecanismos involucrados son motivo de estudio. En general están orientados a modificar resorción o formación por separados, existiendo muy pocos trabajos en los que se ha intentado modificar ambos procesos.

El monofluorofosfato de sodio (MFP) [1] es un compuesto que puede generar fluoruro, que tiene acción osteoformadora [2] y los bisfosfonatos inhiben la acción de los osteoclastos [3].

La remodelación ósea comienza con la fase de resorción por osteoclastos que liberan citoquinas que producirían la diferenciación y proliferación de los osteoblastos [4]. Luego, los osteoblastos rellenan con matriz ósea el defecto. Esta matriz se calcifica dependiente de la presencia de calcio, fosfato, pirofosfato y diversas proteínas no colágenas. Queda claro entonces que una droga antirresortiva no actuará durante la fase de formación y una droga osteogénica tampoco lo hará durante la fase de resorción. Pocos trabajos han combinado terapias osteogénicas y antirresortivas [5,6], pero en ninguno de estos se ha intentado potenciar el efecto de las drogas por manipulación del remodelado óseo.

En este proyecto propone la modificación secuencial de los mecanismos involucrados en la remodelación ósea de manera de producir aumento de la masa ósea.

El presente proyecto propone la administración de una dieta hipocalcica de manera de aumentar la resorción ósea, aumentando la existencia de BMU en fase de resorción. Luego de este período se producirá el cambio a una dieta hipercálcica y se administrará MFP. Mientras el mayor aporte de calcio disminuye la acción osteoclástica, el MFP aumentaría la diferenciación

y proliferación de osteoblastos por acción del fluoruro iniciando la fase de formación. Al final de este proceso se suspenderá la administración de MFP y se mantendrá la dieta hipercálcica y se administrará bisfosfonatos contribuirá al mantenimiento de bajos niveles de resorción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción general de los experimentos

Se utilizaron 105 ratas hembra adultas de la línea Sprague-Dawley, en las que se indujo osteoporosis por ovariectomía bilateral (OVX) [7]. Luego de la ovariectomía los animales fueron separados aleatoriamente en los grupos experimentales que se indican más abajo. Los animales fueron alimentados con dieta balanceada hipo, normo e hipercálcica de acuerdo a las etapas de los experimentos, con el fin de modificar la acción de hormonas que actúan sobre la remodelación ósea. En cirugías, tratamiento y cuidado de las ratas se siguieron normas internacionales [8].

Durante el desarrollo de los experimentos, las ratas fueron alojadas en un bioterio a 24-27 °C y humedad 65-75% con ciclo de 12 horas de luz/oscuridad.

El tratamiento consistió en la administración de monofluorofosfato de sodio (MFP) por sonda orogástrica en solución acuosa (40 mmoles/100 g peso corporal) y ácido zoledrónico (Z) por vía subcutánea (1,5 mg/Kg peso corporal), a los tiempos indicados más abajo. El alimento fue preparado en el laboratorio variando el contenido de calcio: hipocálcica (LCaD, 0.2% de calcio), normocálcica (NCaD, 1% de Calcio) e hipercálcica (HCaD, 2% de calcio).

Luego de la cirugía OVX los animales se distribuyeron aleatoriamente en:

Sham: ratas con OVX simulada, dieta NCaD.

OVX: ratas con OVX, dieta NCaD.

OVX.G1: ratas con cirugía OVX, dieta NCaD, MFP del día 31 al 90, y Z del día 91 al 150.

OVX.G2: ratas con cirugía OVX, dieta LCaD del día 0 al 30 y dieta HCaD del día 31 al 150.

OVX.G3: ratas con cirugía OVX, dieta LCaD del día 0 al 30 y HCaD del día 31 al 150, tratadas con MFP del día 31 al 90 y con Z del día 91 al 150.

El experimento duró 150 días y 7 ratas de cada grupo fueron sacrificadas a los 30, 90 y 150 días. Como consecuencias cada grupo aparece dividido en tres con el día de la eutanasia como subíndice. Luego de la eutanasia se extrajeron los y se utilizaron para evaluar el éxito de la OVX. Se obtuvieron ambas tibias. En la epífisis proximal de la tibia derecha se realizaron medidas histomorfométricas y en la tibia derecha se midió densidad mineral ósea (BMD). Los fémures se utilizaron para medidas biomecánicas de flexión a tres puntos y de compresión.

Medida de la remodelación ósea: Se utilizó como medida de resorción ósea la excreción urinaria de deoxipiridinolina (Dpd, por RIA) y como medida de formación la fosfatasa alcalina ósea plasmática (bAP, con kit comercial, ALP 405, Wiener Lab, Rosario, Argentina), se evaluó la relación bAP/Dpd.

Histomorfometría ósea: Se obtuvieron imágenes de cortes histológicos de la epífisis de la tibia derecha donde se midió:

- 1) volumen óseo, BV/TV (%)
- 2) número de trabéculas, Tb.N (1/mm)
- 3) porcentaje de superficie erodada, ES/BS (%) $[ES \times 100/BS]$
- 4) Número de osteoclastos por unidad de área, N.Oc/mm² (1/mm²) $[N.Oc/TA]$.

Densidad (BMD) y contenido mineral óseo (BMC): Se determinó por densitometría de doble haz

Ensayos biomecánicos: El comportamiento biomecánico se evaluó en la parte media de los fémures a través de un ensayo de flexión a tres puntos. El comportamiento biomecánico del hueso trabecular se evaluó a través de un ensayo de compresión en un corte transversal de 2.5-mm de espesor en la epífisis proximal de los fémures. Se calcularon las siguientes variables biomecánicas:

- 1) Fuerza de fractura (Fx)
- 2) Rigidez
- 3) momento de inercia de sección transversal (CSMI)
- 4) Módulo de Young

Análisis estadístico

Los datos se expresan como media $\pm$ SEM y las diferencias se consideraron significativas si $p < 0.05$.

RESULTADOS

Ensayos bioquímicos

A los 30 días se evaluó la relación bAP/Dpd para estimar el estado de la remodelación ósea. El grupo OVX30 LCaD mostró una relación 15 veces menor que el grupo Sham30 y OVX30 NCaD, garantizando un incremento en la proporción de BMU con alto remodelado. A los 150 la relación bAP/Dpd en OVX.G3150 fue 2-veces mayor que en OVX.G1150 debido a altos valores indicando alta actividad osteoblástica. La Tabla 1 resume los datos presentados en los párrafos preceden

Tabla 1: determinaciones bioquímicas. La misma letra indica diferencias significativas ($p < 0.05$, t de student) entre los grupos.

Day 30	Sham ³⁰	OVX ³⁰ NCaD		OVX ³⁰ LCaD	
Relación bAP/Dpd	0.28	0.24		0.017	
Day 150	Sham ¹⁵⁰	OVX ¹⁵⁰	OVX. G1 ¹⁵⁰	OVX. G2 ¹⁵⁰	OVX.G3 ¹⁵⁰
Relación bAP/Dpd	2.50	1.14	0.58	0.55	1.30

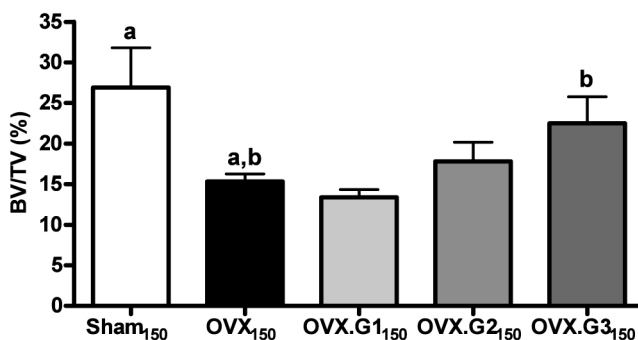
Histomorfometría ósea

A los 30 días se observó un descenso el el valor de BV/TV en los OVX³⁰ NCaD y OVX³⁰ LCaD comparado con el grupo Sham, debido a descenso del número de trabéculas (Tabla 2). En OVX³⁰ LCaD se halló aumento de la ES/BS y el número de osteoclastos.

Tabla 2: Histomorfometría ósea. Letras iguales indican diferencias significativas

Día 30	Sham ³⁰	OVX ³⁰ NCaD		OVX ³⁰ LCaD	
BV/TV (%)	23.77±1.81 a,b	16.75±1.50 a		16.53±1.69 b	
Tb.N (1/mm)	6.02±0.54 a,b	4.46±0.31 a		3.91±0.32 b	
ES/BS (%)	6.38±2.36	7.45±1.05 a		12.41±1.90 a	
N.Oc/TA (1/mm ²)	1.06±0.49	0.19±0.19 a		3.06±1.08 a	
día 150	Sham ¹⁵⁰	OVX ¹⁵⁰	OVX.G1 ¹⁵⁰	OVX.G2 ¹⁵⁰	OVX.G3 ¹⁵⁰
BV/TV (%)	26.90±4.89 a	15.31±0.96 a,b	13.38±0.95	17.81±2.37	22.49±3.29 b
Tb.N (1/mm)	4.93±0.73 a	3.09±0.21 a,b	2.83±0.24 c	3.48±0.26 d	4.34±0.28 b,c,d
ES/BS (%)	7.08±2.14	5.09±0.96 a	9.21±3.08	6.49±1.78	10.45±2.54 a
N.Oc/TA (1/mm ²)	1.45±0.62	0.90±0.25	2.06±0.74	0.28±0.18	2.45±1.23

Luego de 150 días el valor de BV/TV en el grupo OVX.G3¹⁵⁰ se incremento alcanzando valores que no discrepan del grupo sham, y dicho valor se debió aun incremento en el número de trabéculas (Tabla 2 y Figure 1). Los grupos OVX.G1¹⁵⁰ and OVX.G2¹⁵⁰ no mostraron aumento del valor de BV/TV indicando que la combinación del tratamiento secuencias con MFP/Z con diferentes contenido de calcio en la dieta fueron los responsable del efecto sobre la masa ósea trabecular.

**Figura 1.** Volumen trabecular ósea luego de 150 días de tratamiento. La misma letra indica diferencias significativas. media±SEM

Densidad mineral ósea

La BMD descendió 7.5% en el grupo OVX¹⁵⁰ comparado con el grupo Sham¹⁵⁰. Por otra parte los grupos OVX.G1¹⁵⁰ y OVX.G3¹⁵⁰ incrementaron 16.16% y 9.76%, respectivamente.

Ensayos biomecánicos

El grupo OVX¹⁵⁰ mostró un descenso significativo respecto del grupo Sham en la resistencia ósea en los ensayos de compresión (Tabla 3), mientras que OVX.G3¹⁵⁰ mostró mayor resistencia que los otros grupos OVX. El grupo OVX.G3¹⁵⁰ mostró un incremento en la fuerza de fractura del hueso cortical comparado con el grupo OVX¹⁵⁰ indicando mayor resistencia, explicada por mejores propiedades del material, como lo indica el valor del módulo de Young. El grupo OVX.G1¹⁵⁰ y OVX.G2¹⁵⁰ no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo OVX¹⁵⁰.

Tabla 3: Ensayos biomecánicos. Letras iguales indican diferencias significativas

Ensayo de flexión a tres puntos					
día 150	Sham ¹⁵⁰	OVX ¹⁵⁰	OVX.G1 ¹⁵⁰	OVX.G2 ¹⁵⁰	OVX.G3 ¹⁵⁰
Fuerza de fractura (N)	193.70±9.41	206.70±4.99 a	193.90±8.78	208.10±4.55	227.30±5.70 a
módulo Young (GPa)	6.54±1.64	5.43±0.76	6.35±1.12	5.73±1.02	7.47±1.74
ensayo de compresión					
día 150	Sham ¹⁵⁰	OVX ¹⁵⁰	OVX.G1 ¹⁵⁰	OVX.G2 ¹⁵⁰	OVX.G3 ¹⁵⁰
Fuerza de fractura (N)	74.77±9.72 a	26.78±3.96 a,b	26.63±2.55	21.97±3.69	42.42±5.42 b
rigidez (N/mm)	804.0±146.6 a	258.4±48.3 a,b	303.1±63.2	336.2±138.6	608.9±108.4 b
Módulo Young (GPa)	0.28±0.052 a	0.09±0.02 a,b	0.11±0.022	0.12±0.05	0.21±0.04 b

DISCUSIÓN

Hemos propuesto una terapéutica secuencias con una droga anabólica (MFP) seguido de una terapia antirresortiva con ácido zoledrónico (Z), combinada con cambio en el contenido de calcio de la dieta. La administración de la dieta LCaD en los primeros 30 días se aplicó para producir un incremento en la resorción ósea y el número de BMU en dicho estado. Se administró MFP por 60 días como droga anabólica conjuntamente con dieta HCaD, para

reducir la actividad de los osteoclastos y proveer calcio para el proceso de mineralización. Finalmente el tratamiento con zoledronato tuvo el objetivo de bajar el remodelado óseo y preservar el hueso formado.

Se halló aumento del volumen óseo en el grupo con este tratamiento, llegando a valores próximos al grupo sham. Los resultados hallados en los otros grupos indican que no es solo la consecuencia del tratamiento farmacológico o el alto contenido de calcio de la dieta. Asimismo el hueso fue más resistente, comprobación realizada tanto en hueso cortical como trabecular.

El tratamiento con MFP y ácido zoledrónico, combinado con cambios en el contenido de calcio de la dieta pueden incrementar la masa ósea, la densidad mineral ósea y las propiedades biomecánicas del hueso.

ABSTRACT

Osteoporosis is the consequence of excessive bone resorption or inappropriate bone formation. Monofluorophosphate (MFP) as an anabolic drug, increases bone mass. On the other hand, zoledronate is an antiresorptive drug. This work proposed a sequential treatment with MFP and Z simultaneously with changes in the calcium content of diet. Low calcium diet (LCaD) was administered to produce an increase in bone remodeling at the beginning of treatment and the change to a high calcium diet (HCaD), reduces osteoclast activity and provides appropriate calcium concentration.

Five experimental groups were performed: **Sham:** Simulated operated rats fed with normal Ca diet (NCaD). **OVX: ovariectomized rats (OVX)** fed with NCaD. **OVX.G1:** OVX fed with NCaD, treated with MFP from day 31 to 90, and with Z from day 91 to 150. **OVX.G2:** OVX fed with LCaD diet from day 0 to 30, and HCaD from 31 to day 150. **OVX.G3:** OVX fed with LCaD and HCaD treated with MFP and Z. The experiment lasted 150 days. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. differences were considered significant when $p < 0.05$.

After 150 days BV/TV in OVX.G3 ($22.49 \pm 3.29\%$) increased reaching similar values to sham group ($26.90 \pm 4.89\%$) due to an increased in trabecular number. Dual X-ray absorptiometry bone analysis showed an increase in OVX.G3 of 9.76% compared OVX. The fracture load at the cortical bone in OVX.G3 (227.30 ± 5.70 N) showed an increase compared with OVX (206.70 ± 4.99 N) indicating a greater resistance to fracture. The compression test showed that the OVX.G3 group had a higher fracture load, ultimate load and stiffness which can be explained by the increase in trabecular bone assessed by histomorphometry.

We concluded that the sequential treatment with MFP and zoledronic acid increases trabecular bone mass, BMD and biomechanical properties.

REFERENCIAS

1. Sebert JL, Richard P, Menecier I, Bisset JP, Loeb G. Monofluorophosphate increase lumbar bone density in osteopenic patients: A double-masked randomized study *Osteoporosis Int.* 1995; 5:108-14.
2. Farley JR, Wergedal JE, Baylink DJ. Fluoride directly stimulates proliferation and alkaline phosphatase activity of bone-forming cells. *Science*, 1983. 222:330-2.
3. Rogers MJ. From molds and macrophages to mevalonate: a decade of progress in understanding the molecular mode of action of bisphosphonates. *Calcif Tissue Int.* 2004; 75:451-61.
4. Hill PA, Orth M. Bone remodelling. *British J Orthodon.* 1998; 25:101-107.
5. Black DM, Greenspan SL, Ensrud KE, Palermo L, McGowan JA, Lang TF, Garnero P, Bouxsein ML, Bilezikian JP, Rosen CJ. The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med.* 2003 Sep 25;349(13):1207-15.
6. Reginster JY, Felsenberg D, Pavo I, Stepan J, Payer J, Resch H, Gluer CC, Muhlenbacher D, Quail D, Schmitt H, Nickelsen T. Effect of raloxifene combined with monofluorophosphate as compared with monofluorophosphate alone in postmenopausal women with low bone mass: a randomized, controlled trial. *Osteoporosis Int.* 14(9):741-749. 2003.
7. Di Loreto V, Pera LI, Rigalli A. Ovariectomy. En Rigalli A, Di Loreto V. *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat.* Editorial Taylor and Francis Group. CRC Press. Boca Ratón, USA. pp. 149-151. 2009.
8. Canadian Council on Animal Care Guidelines. Guide to the care and use of experimental animal. www.cac.ca.

CARACTERIZACIÓN DE LA SÍNTESIS Y/O ACUMULACIÓN DE HEPARÁN SULFATO EN EL OVOCITO DURANTE SU MADURACIÓN Y SU PAPEL EN LA DESCONDENSACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE.

Dra. Marina Romanato, Lic. Vanina Laura Julianelli
(IByME-CONICET)

En nuestro laboratorio hemos estudiado la descondensación de la cromatina del espermatozoide humano y el papel que el heparán sulfato (HS) tiene en dicho proceso, considerando que es una molécula ubicua en células eucariotas y de estructura similar a la heparina, cuya actividad descondensante *in vitro* está bien documentada. Datos en la bibliografía indicaban que la descondensación de la cromatina del espermatozoide humano, necesaria para la formación del pronúcleo masculino luego de la entrada del espermatozoide al ooplasma durante la fertilización, podía llevarse a cabo *in vitro* con agentes como el SDS o la heparina, junto con la acción de un agente reductor de puentes disulfuro como el glutatión (GSH) (Huret, 1986). En las distintas especies estudiadas, el proceso de descondensación involucra la reducción de los puentes disulfuro de las protaminas que han remplazado a las histonas durante la espermiogénesis y luego la acción de algún aceptor de protaminas, con alta carga negativa, que coadyuve a la separación de las mismas del ADN y a la reinstalación de histonas procedentes del ovocito para conseguir una cromatina adecuadamente descondensada, capaz de hacer singamia y transcripcionalmente activa (Perreault, 1983). En gran parte de los trabajos publicados, se usó a la heparina como aceptor de protaminas y, en ausencia de una molécula conocida que cumpliera ese papel *in vivo*, como ocurre con la nucleoplasmina en anfibios, algunos peces y *Drosophila melanogaster* (Philpott y col, 1991; Kawasaki y col, 1994; Ohsumi y Katagiri, 1991) algunos autores llegaron a proponer que la heparina podría ser el agente descondensante *in vivo* (Reyes y col, 1989). La hipótesis que dio lugar a mi trabajo de Tesis doctoral fue que el HS era el agente descondensante de la cromatina del espermatozoide humano *in vivo* debido a la ausencia de heparina en el ovocito o su entorno. Con esta hipótesis se plantearon los objetivos de analizar si el HS podía remplazar a la heparina en la descondensación de

la cromatina en ensayos *in vitro* y, en caso que esto resultase positivo, si este glicosaminoglicano (GAG) se encontraba en el ovocito, siendo el ooplasma el lugar donde ocurre la descondensación.

Con estas premisas se realizaron los experimentos correspondientes y, efectivamente, se demostró que el HS era la molécula descondensante, junto con el GSH y que este GAG se encuentra presente en el ooplasma de ovocitos murinos. Estos experimentos conforman mi trabajo de Tesis doctoral y han sido publicados (Romanato y col, 2003, 2005, 2008). Sin embargo, no hay evidencia acerca de si el propio ovocito es capaz de sintetizar HS o si este GAG procede de las células de la granulosa que se encuentran en íntimo contacto y permanente interacción con el mismo y cuya capacidad de sintetizar proteoglicanos de HS, como así también de internalizar las cadenas de HS de su superficie se encuentra ampliamente documentada (Yanagishita y col, 1992a y 1992b). El tráfico de proteínas desde las células de la granulosa hacia el interior del ovocito es un fenómeno conocido desde hace mucho tiempo (Glass, 1971) y podría muy bien hacerse extensivo a otras macromoléculas como los GAGs.

Datos preliminares de nuestro laboratorio, que sugerirían una ubicación alternativa del GAG en el espacio perivitelino, con una distribución zonal focalizada y no homogénea, resultan de la observación al microscopio confocal, luego de la marcación inmunohistoquímica de ovocitos de ratón con un anticuerpo anti-HS. (Los ovocitos de ratón fueron los utilizados durante el desarrollo de la Tesis doctoral por razones éticas, tanto para producir la descondensación de la cromatina de espermatozoides humanos, como para determinar la presencia de HS en el interior del ovocito). Esas imágenes plantean otro posible mecanismo de acción del HS en la descondensación y es que el espermatozoide lo reciba en su tránsito hacia el interior del ovocito y lo internalice para, luego utilizar la concentración más elevada del interior en el ooplasma y así, conjuntamente con el GSH presente en el ovocito, lograr la descondensación del núcleo espermático. Si este HS se encuentra, efectivamente, también en el espacio perivitelino cabe preguntarse nuevamente si representa un fenómeno de exocitosis o reciclado desde el mismo ovocito o una captación o transporte desde un sitio de producción externo al mismo (células de la granulosa). Por esto mismo, se plantean dos hipótesis alternativas: que el HS sea por un lado un producto de síntesis de las células foliculares que, luego, es transportado hacia el interior del ovocito, quedando retenido en el espacio perivitelino o que sea un producto de síntesis del propio ovocito, siendo externalizado e incorporado en la forma de proteoglicano (sindecan) en la membrana del ovocito hacia el espacio perivitelino.

Por otra parte, se ha demostrado que los niveles de GSH, encargado de tiorreducir las protaminas espermáticas, en el ooplasma se incrementan durante la maduración ovocitaria (Zirkin y col, 1985). Es sabido que la capacidad del ovocito para descondensar la cromatina espermática varía a lo largo de la vida del ovocito, desde su estadio de vesícula germinal hasta la formación del cigoto (Usui y Yanagimachi, 1976), presentando su máximo cuando el ovocito se encuentra en Metafase II, listo a ser penetrado por un espermatozoide.

Objetivos Generales:

La capacidad del ovocito para descondensar la cromatina espermática es variable a lo largo del proceso de ovogénesis. En concordancia con la propuesta de nuestro laboratorio que el heparán sulfato sería un agente descondensante del espermatozoide humano *in vivo*, el objetivo general del presente trabajo es estudiar la presencia de heparán sulfato en el ovocito durante la ovogénesis y determinar si el glicosaminoglicano es sintetizado por el mismo ovocito o importado de las células foliculares.

Objetivos Específicos:

1. Aislar ovocitos de ratón correspondientes a los distintos estadios de maduración ovocitaria
2. Determinar la presencia y localización de heparán sulfato en ovocitos de distinto grado de maduración
3. Estudiar la capacidad sintética de heparán sulfato por el mismo ovocito, como así también su importación desde las células foliculares.
4. Como resultado hemos logrado recuperar ovocitos en diferentes estadios de maduración poniendo énfasis en ambos extremos (vesícula germinal (VG) y maduros (M II). Dichos ovocitos fueron utilizados para las diferentes técnicas aplicadas en este estudio.

Para determinar la presencia de heparán sulfato en ovocitos de ratón en diferentes estadios de maduración, hemos aplicado la técnica de inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo primario monoclonal anti-heparán sulfato y un anticuerpo secundario anti-IgM de ratón marcado con FITC. El protocolo

aplicado es el mismo que se utilizara durante mi Tesis Doctoral (Romanato y col, 2008). Los resultados observados por microscopia confocal muestran claramente una intensa marca positiva en el citoplasma tanto de ovocitos maduros como así también de ovocitos en estadio de VG.

Por otra parte, para determinar la capacidad biosintética de ovocitos aislados, se incubaron, como primera instancia, complejos cúmulus-ovocito en presencia de precursores radiactivos observando la separación de las moléculas marcadas con ^{35}S de aquellas marcadas con ^3H de acuerdo a su radio hidrodinámico, proporcional al tamaño, recolectando las fracciones cada minuto, a un flujo de 0.4ml/minuto controlado con una bomba peristáltica.

De acuerdo a los resultados expuestos en el presente reporte, resulta evidente el papel que cumple el heparán sulfato como agente descondensante, dado que a los resultados ya publicados sobre su papel en el proceso de descondensación del espermatozoide humano, ahora se pudo incluir la evidencia, por primera vez, de su existencia en el ovocito murino en diversos estadios de diferenciación. Si bien para el presente informe y como parte del plan de trabajo aprobado para este subsidio, el estudio se realizó con ovocitos murinos, nuestro laboratorio ya cuenta con resultados preliminares que indican la presencia de esta molécula también en ovocitos humanos.

Como la presencia de esta molécula en el ovocito no es prueba concluyente de que la síntesis de la misma ocurra en esa misma célula, comenzamos estudios de marcación metabólica a fin de dilucidar este hecho. Aprovechando la característica molecular de la presencia de azufre en los disacáridos repetitivos de la estructura de glicosaminoglicanos, se pudo identificar especies con un rango de peso molecular. Si bien son resultados preliminares que deben continuarse con un estudio más detallado, por ejemplo con el uso de enzimas degradantes de glicosaminoglicanos para determinar la naturaleza de estas especies (heparán, condroitín o keratán sulfato) resulta muy alentador el hecho de haber conseguido marcación con tan poco material celular (hay que recordar que se utiliza el resultante de la superovulación de ratones hembra y que el rendimiento puede ser muy variable, llevando a que algunas incubaciones deban ser realizadas con muy pocas células) y que se observen diferencias al usar los ovocitos desnudos o aquellos que todavía se encuentran rodeados de las células de la granulosa. Es muy probable que el pico observado hacia el fin de la elución, es decir correspondiente a las especies con menor peso molecular, y que muestra una relación entre radioisótopos bastante constante, además de constituir un pico muy parejo, sea el remanente de las moléculas utilizadas para la marcación. Esto indicaría que

los ovocitos por sí solos no tendrían la capacidad de sintetizar glicosaminoglicanos y, muy probablemente, los reciban de las células que forman el complejo cúmulo ovocito. Al analizar la marcación de las células de la granulosa, aisladas, podremos ver si las mismas poseen esta capacidad biosintética.

Entonces, se podrá emprender el camino hacia la dilucidación del camino metabólico que lleva a la incorporación del heparán sulfato en el citoplasma ovocitario y agregar una pieza más al complejo rompecabezas que constituye el proceso de fertilización en mamíferos.

ABSTRACT

We studied chromatin decondensation in human spermatozoa and the role of heparan sulfate (HS) in this process, involving reduction of protamine disulfide bonds and their exchange for histones from the oocyte, thus providing an adequately condensed, transcriptionally active chromatin, capable of syngamy. Thinking of HS as the decondensing agent of human sperm chromatin *in vivo*, we found it could replace heparin (a known decondensing agent *in vitro*, structurally similar to HS, but absent in the oocyte) and that HS was present in the ooplasm. Using mouse oocytes labeled with anti-HS, an alternative location of HS in the perivitelline space was observed, possibly indicating that sperm received HS as they passed into the oocyte, internalized it and, together with HS and GSH present in the oocyte, started decondensation. So far, there is no indication if the perivitelline HS represents exocytosis, recycling from the oocyte or recruitment from an alternative production site (granulose cells).

The oocyte ability to decondense sperm chromatin varies from germinal vesicle stage (GV) to zygote, showing a peak in MII, ready for sperm penetration. We studied the presence of HS in the oocyte during oogenesis and tried to elucidate whether it is synthesized by the oocyte or imported from follicular cells.

Murine oocytes, recovered in GV and MII stages, both showed the presence of HS. When determining the biosynthetic capacity of isolated COCs and oocytes, by metabolic labeling, we observed that there is indication that oocyte alone could synthesize glycosaminoglycans, but rather be a product of granulose cells. Further analysis of granulose cells alone will reveal if they possess this biosynthetic ability. Then, we could proceed towards the elucidation of the pathway leading to the incorporation of HS into the ooplasm adding another piece to the complex puzzle that constitutes the process of fertilization in mammals.



INMUNIDAD INDUCIDA POR CEPAS DE *M. TUBERCULOSIS* PREVALENTES EN ARGENTINA: RECEPTORES Y MOLÉCULAS INVOLUCRADAS EN EL PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS

Bqca. María Mercedes Romero

Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex",
Academia Nacional de Medicina

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad crónica cuyo agente infeccioso es *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), un bacilo intracelular obligatorio que ingresa en su huésped por vía aérea a través de pequeñas gotas que lo contienen. En el pulmón, parasita a los macrófagos alveolares (MΦ) siendo las primeras células en ser infectadas por *Mtb* [1]. Las células dendríticas (DC) constituyen una red densa en la mucosa respiratoria [2] y su interacción temprana con *Mtb* es fundamental para montar una respuesta inmune protectora particularmente en la TB primaria. Las DC y los MΦ infectados inician una respuesta inflamatoria exudativa con influjo de neutrófilos (PMN), linfocitos y monocitos (Mo) por efecto de factores quimiotácticos presentes en el foco infeccioso. La respuesta inmune generalmente contiene la infección, pero no elimina la bacteria, aunque el daño se minimiza por fagocitosis de la misma con posterior formación de una barrera de células inflamatorias rodeando al MΦ infectado (granuloma). Las DC inmaduras capturan y procesan activamente antígenos (Ag), y como respuesta a estímulos tales como productos bacterianos o citoquinas (CKs) inflamatorias, inician un programa de activación. Durante este proceso, las DC abandonan los tejidos periféricos migrando hacia las áreas dependientes de células T de los órganos linfoides secundarios promoviendo la respuesta inmune adaptativa [3]. Básicamente, las DC y los MΦ son el reservorio natural del *Mtb* y si bien la respuesta inmune innata es inicialmente dirigida por los MΦ, la subsiguiente respuesta celular es mediada por DC. Posiblemente, este hecho se deba a que el *Mtb* inhibe en el MΦ la fusión fagolisosomal permaneciendo allí viable, pero a su vez evitando la presentación antigénica. Por el contrario las DC son capaces de controlar la replicación de *Mtb* sin matarlo constituyendo un reservorio *in vivo*, particularmente en los ganglios

linfáticos [4,5]. La estrategia empleada por la respuesta innata es reconocer estructuras altamente conservadas presentes en los microorganismos, patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) a través de receptores de reconocimiento de patrones (*pattern-recognition receptors*, PRRs). *Mtb* puede ingresar a las DC principalmente por el receptor de manosa (MR) y DC-specific intracellular adhesión molecule-3 grabbing nonintegrin (DC-SIGN) que reconocen específicamente carbohidratos con residuos de manosa, como así también por el CD11b y CD14. Además, *Mtb* viable interacciona con los receptores *Toll-like* (TLR) TLR2, TLR9 y TLR4 presentes en DC y MΦ induciendo producción de CKs inflamatorias y quemoquinas para la extravasación de células periféricas al sitio de infección.

Los PMN son un componente clave en la primera línea de defensa contra patógenos como el *Mtb* ya que el flujo de estas células a los pulmones es uno de los primeros eventos en la patogénesis de la TB. La presencia de componentes bacterianos induce la up-regulación de la integrina β_2 CD11b [6], como así también la producción de CKs inflamatorias que contribuyen al reclutamiento de leucocitos al sitio de infección. La activación de PMN desencadena importantes mecanismos microbicidas tales como la producción de enzimas proteolíticas, péptidos antimicrobianos y la liberación de especies reactivas del oxígeno (ROS), esenciales para la muerte de la bacteria [7].

Desde su aislamiento en 1905, la cepa de *Mtb* H37Rv, ha sido aplicada exhaustivamente en investigación biomédica pues contrariamente a algunos aislados clínicos, ha retenido su virulencia en modelos animales de tuberculosis, es susceptible a drogas y a la manipulación genética. A nivel global se han descrito seis linajes que parecen distribuirse en forma preferencial entre los grupos étnicos. En nuestro país el linaje prevalente es el Euro-Americano que comprende a diferentes familias de *Mtb* entre ellas: Haarlem, Latino-Americano-Mediterráneo (LAM), familia X (Europea IS6110 de bajas bandas) y familia T. Se consideran multi-resistentes a drogas (MDR), aquellos aislados clínicos de *Mtb* resistentes a isoniazida y rifampicina, las drogas más efectivas para el tratamiento de la TB. De acuerdo a la OMS y la Liga Internacional contra la Tuberculosis, Argentina es considerada como un "punto caliente" para MDR-TB desde mediados de la década del 90 [8]. Los primeros casos fueron detectados entre pacientes con SIDA, siendo el foco más importante el comunicado por el Hospital Muñiz de Buenos Aires. En este hospital se aisló una cepa resistente a 6 drogas denominada cepa-Muñiz (M) perteneciente al linaje Haarlem, siendo posteriormente comunicada en otros centros de salud del área metropolitana.

En los últimos años se han podido identificar varios genes involucrados en la virulencia y la patogenicidad del *Mtb* [9]. Pequeñas variaciones en estos genes, pueden determinar grandes diferencias fenotípicas a nivel de la estructura de la micobacteria condicionando el reconocimiento del *Mtb* por las células del sistema inmune. En este contexto, se han reportado diferencias en la respuesta inmune evocada entre cepas resistentes del linaje Haarlem [10]. Es conocida la importancia que las variaciones genéticas tienen para la formulación de vacunas protectoras [11] por lo tanto, para lograr este objetivo es importante determinar la respuesta inmune inducida por los linajes autóctonos y su interacción con el huésped.

En nuestro grupo de trabajo hemos caracterizado ampliamente el efecto de la cepa de referencia H37Rv sobre la maduración de DC diferenciadas *in vitro* a partir de Mo humanos [12]. H37Rv induce en DC, altos niveles de activación y maduración, con aumento en la expresión de CD80, CD83, CD86, HLA-DR, y disminución de CD1b, producción de IL-12 e IFN γ . Asimismo, estos datos correlacionaron con una elevada capacidad funcional (ensayo mixto linfocitario, MLR).

Hemos demostrado también que la interacción temprana de Mo de dadores sanos con H37Rv irradiado, altera la diferenciación hacia DC *in vitro*. La población resultante (*Mtb*DC) preserva el marcador monocítico CD14 y muestran menores niveles de expresión de moléculas CD1 de tipo I (CD1a, CD1b y CD1c). Además, las *Mtb*DC muestran una alta expresión de CD86 pero pierden DC-SIGN y MR, principales receptores involucrados en la entrada de *Mtb* en DC. Este patrón de diferenciación alterado del Mo en presencia de *Mtb*, resulta similar al obtenido en pacientes con tuberculosis pulmonar activa [13].

Demostramos además que H37Rv induce activación en PMN en bajas relaciones *Mtb*:PMN y que además, acelera la muerte por apoptosis *in vitro* [14] mediante la activación de la vía TLR2/p38 MAPK [15]. Como consecuencia, los PMN circulantes de individuos infectados se activan y son reclutados al pulmón, donde mueren por apoptosis tras el contacto con *Mtb*. La apoptosis previene la liberación del contenido citotóxico de los PMN hacia el entorno extracelular, proceso que tiene lugar si la célula muere por necrosis. Está demostrado que la generación de ROS por la enzima NADPH oxidasa durante la fagocitosis de *Mtb* opsonizado [16] induce rápidamente apoptosis en PMN. Por otra parte, la activación de PMN y la liberación de CKs y otros agentes pro-inflamatorios, involucra la vía de las MAPK, entre ellas p38 MAPK y ERK [17].

Dados estos antecedentes quisimos caracterizar la respuesta inducida por los aislados clínicos de *Mtb* prevalentes en nuestro país y compararla con la cepa de referencia H37Rv. Los aislados estudiados son: LAMs, cepa sensible a drogas perteneciente al linaje LAM; y Haarlem, tanto sensibles (Hs) como multiresistentes a drogas (M y 410) pertenecientes al linaje Haarlem.

RESULTADOS

Como primer parte del trabajo iniciamos el estudio de la respuesta de los PMN frente a los diferentes aislados clínicos de *Mtb*. Para ello investigamos si las diferentes cepas tienen una capacidad diferencial de entrar en los PMN. Para ello se realizó el ensayo de fagocitosis (Figura 1 A) utilizando marcación del *Mtb* con Ioduro de Propidio. La cepa LAMs fue fagocitada con mayor eficiencia por los PMN comparado con las cepas Haarlem, M y 410. Este resultado se correlaciona con lo observado en la Figura 1B) la cual muestra la oxidación de 123-DHR como medida indirecta de fagocitosis. Se comparan las cepas LAMs vs M y las cepas LAMs vs 410. Los histogramas muestran que la cepa LAMs induce mayor oxidación de 123-DHR lo cual indica indirectamente además de una mayor generación de ROS, una mayor fagocitosis que las cepas Haarlem. Podemos decir entonces que las cepas tienen distinta capacidad de entrar a los PMN siendo mayor para la cepa LAMs con respecto a las Haarlem.

Posteriormente evaluamos la activación a nivel de receptores de membrana y la muerte por apoptosis de los PMN frente a los diferentes aislados clínicos de *Mtb*. Debido a los resultados obtenidos anteriormente con las cepas Haarlem M y 410, decidimos incorporar al trabajo a modo de control, una cepa del mismo linaje pero sensible a drogas, Hs.

Como marcadores de activación se midió la expresión de CD11b, molécula de adhesión y receptor de entrada para el *Mtb*; y CD66b, presente en los gránulos citoplasmáticos y que se expresa por degranulación en presencia de un estímulo. Como se observa en la Figura 2 A), Las cepas H37Rv y LAMs inducen mayor expresión de ambos marcadores comparado con las cepas del linaje Haarlem, siendo la cepa M la que menor efecto produce.

Figura 1 - A)

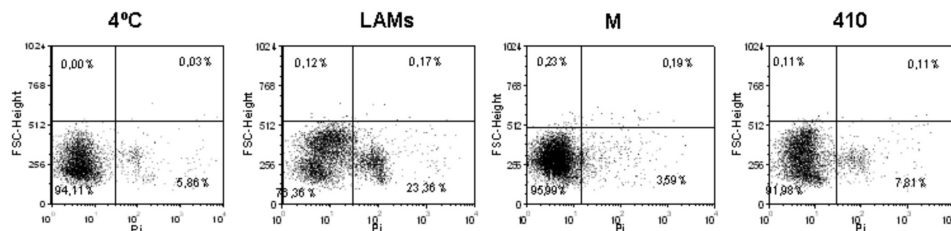
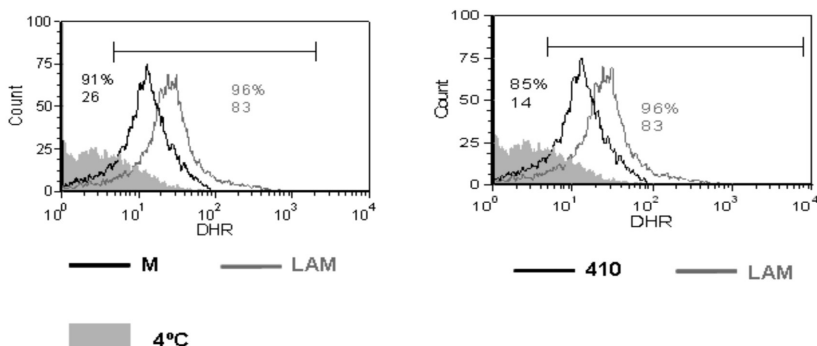


Figura 1 - B)



PMN se aislaron por centrifugación con Ficoll-Hipaque y sedimentación con dextrán 6%, removiéndose los glóbulos rojos residuales por lisis hipotónica. A) Ensayo de fagocitosis: 3×10^6 /ml PMN en medio RPMI 10% SFB se enfrentaron a relación *Mtb*:PMN 10:1 durante 90 minutos con las cepas LAMs, o H (cepas M y 410) marcadas con Ioduro de Propidio (PI) detectándose por citometría de flujo. B) Como medida indirecta de fagocitosis se midió la producción ROS por oxidación de 123-DHR. Para esto, las diferentes cepas se marcaron con 123-DHR (5µg/ml) durante 30 minutos a 37 °C y se enfrentaron a los PMN a relación *Mtb*:PMN 50:1 durante 90 minutos a 37 °C o a 4 °C. La oxidación de la 123-DHR se midió por citometría de flujo.

Durante el proceso de muerte por apoptosis se activan proteasas (Cas-pasas) y se expone en la cara externa de la membrana celular el fosfolípido fosfatidilserina, que comúnmente se encuentra en la cara interna. La Anexi-naV- FITC se una a fosfatidilserina y puede detectarse por citometría de flujo.

La figura 2B) muestra que tanto las cepas LAMs como la H37Rv inducen apoptosis en los PMN, a diferencia de las cepas Haarlem que no lo hacen. Esto correlaciona con la medida de la Caspasa 3, siendo nuevamente la cepa M la de menor efecto.

Figura 2 - A)

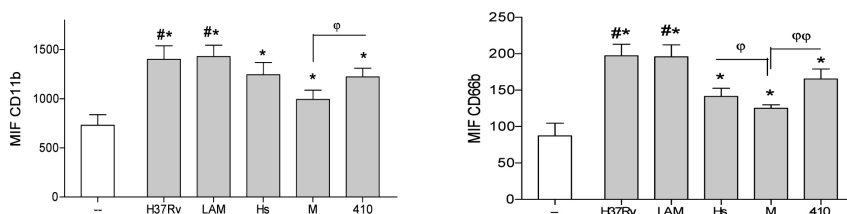
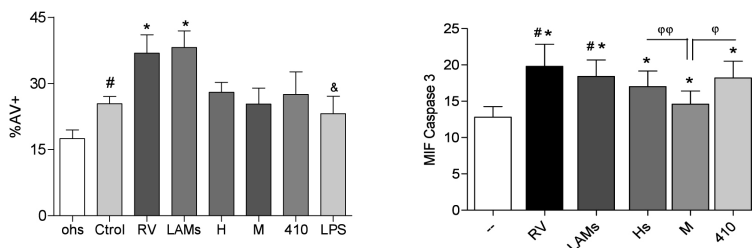


Figura 2 - B)



PMN se aislaron por centrifugación con Ficoll-Hipaque y sedimentación con dextrán 6%, removiéndose los glóbulos rojos residuales por lisis hipotónica. A) *Medida de activación*: 3×10^6 PMN /ml en medio RPMI 1% SFB se enfrentaron a relación *Mtb*: PMN 1:2 con los diferentes aislados clínicos durante 3 horas a 37°C. Luego se marcó la superficie celular con anticuerpos anti CD11b y CD66b detectándose por citometría de flujo. (* $p < 0.05$ vs control; # $p < 0.05$ vs. Hs, M y 410; φ $p < 0.05$ vs. M). B) *Ensayo de Anexina V- FITC*: 3×10^6 PMN /ml en medio RPMI 1% SFB se enfrentaron a relación *Mtb*: PMN 1:2 con los diferentes aislados clínicos durante 18 horas a 37°C. Luego se marcó con Anexina V / Pi y se detectó por citometría de flujo (* $p < 0.05$ vs control, # $p < 0.05$ vs 0hs). *Caspasa 3*: PMN /ml en medio RPMI 1% SFB se enfrentaron a relación *Mtb*: PMN 1:2 con los diferentes aislados clínicos durante 5 horas a 37°C. Se permeabilizó la membrana y se marcó con anticuerpo anti Casapa3-FITC. La fluorescencia se detectó por citometría de flujo. (* $p < 0.05$ vs. control; # $p < 0.05$ Hs, M y 410; φ $p < 0.05$ vs M)

En el trabajo hasta aquí realizado caracterizamos la respuesta de los PMN frente a los distintos aislados clínicos de *Mtb* y la comparamos con la cepa de referencia H37Rv. Observamos que las cepas de *Mtb* tienen una capacidad diferencial de entrar en los PMN como así también de inducir activación y de desencadenar muerte por apoptosis.

Así como a nivel de la respuesta innata los PMN juegan un rol crucial en la respuesta inmune frente al *Mtb*, las DCs son fundamentales para iniciar una respuesta protectora frente a este patógeno. En el proceso crónico de la tuberculosis, el pool de DCs tisulares debe renovarse por la llegada al sitio infeccioso, de células progenitoras como los monocitos (Mo) circulantes. En estudios previos caracterizamos el efecto de H37Rv en el proceso de diferenciación de Mo a DCs y observamos la generación de un perfil alterado CD1a^{low}/CD14^{high} y DCSIGN^{low}/CD86^{high}.

Debido a esto, decidimos evaluar el efecto de los diferentes aislados clínicos sobre el proceso de diferenciación de Mo a DCs, midiendo la expresión de CD14, CD1a, DC-SIGN y CD86.

Como se observa en la figura 3A todas las cepas inducen una menor expresión de CD1a con respecto al control (iDC), sin embargo las cepas H37Rv y Hs tienen mayor efecto que las cepas M, LAMs y 410. En cuanto al CD14, las cepas H37Rv y LAMs son las que más conservan la expresión de este receptor, siendo mayor el efecto para la cepa H37Rv.

La figura 3B muestra que todas las cepas disminuyen la expresión del DC-SIGN como así también aumentan la expresión del CD86 de manera comparable a la H37Rv, generando el perfil DC-SIGN^{low}/CD86^{high}.

Figura 3 - A)

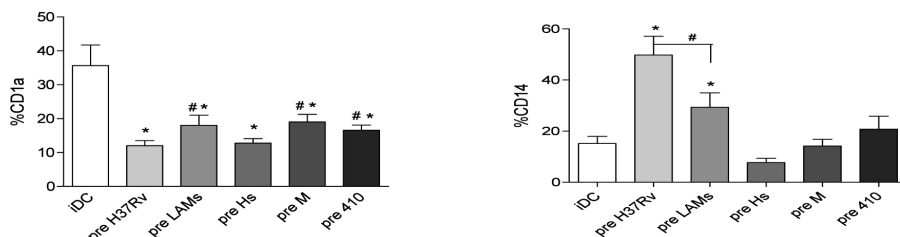
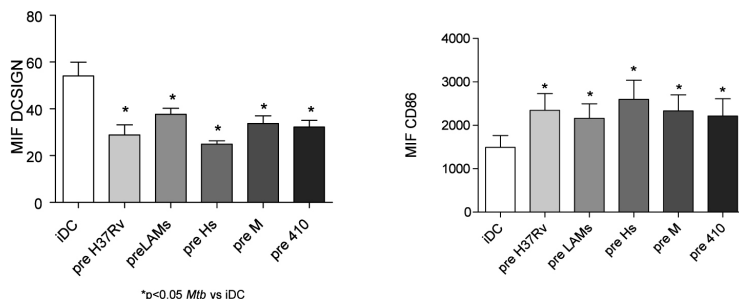


Figura 3 - B)



PBMC se aislaron de sangre de individuos sanos por centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque. Las MoDC se obtuvieron incubando en placas de 6 pocillos las PBMC durante 2h en estufa con (10 ng/ml) GM-CSF, luego de lo cual se removieron las células no adherentes, se lavó la placa con SF tibia y se adicionó medio RPMI-1640 suplementado con SFB 10%, penicilina (100U/ml) streptomycin (100µg/ml) (medio completo, MC) con el agregado de GM-SCF (50 ng/ml) IL-4 (10ng/ml) cultivándose en estufa por 7 días, en presencia (pre*Mtb*) relación 2:1 *Mtb*:Mo. o ausencia de *Mtb* (IDC). Luego se detectó la expresión de A) CD1a y CD14 y B) DCSIGN y CD86 por citometría de flujo. (*p<0.05 vs IDC; #p<0.05 vs H37RV y Hs)

Los resultados obtenidos muestran que diferentes aislados clínicos al igual que la cepa H37Rv, interfieren en el proceso de diferenciación de monocitos (Mo) a células dendríticas lo cual podría sugerir la influencia del genotipo de *Mtb* en la respuesta innata y consecuentemente en la inducción de la adaptativa.

El control del crecimiento del *Mtb* no sólo depende de la capacidad del huésped para desarrollar una respuesta inmune efectiva, sino también de la habilidad del patógeno para emplear mecanismos de escape que eviten o inhiban mecanismos de reconocimiento. Como última parte del trabajo evaluamos la capacidad presentadora de las DCs frente a los aislados clínicos de *Mtb* mediante ensayos de proliferación específica y reacción mixta linfocitaria (MLR).

Como se observa en la figura 4A, todas las cepas de *Mtb* fueron capaces de inducir proliferación de linfocitos autólogos en individuos PPD+, siendo las cepas M y 410 las que indujeron menor respuesta. Estos resultados concuerdan con lo observado en la figura 4B, donde se observa un mayor índice de proliferación de linfocitos heterólogos con las cepas H37Rv, LAMs y Hs, con respecto a las cepas M y 410.

Figura 4 - A)

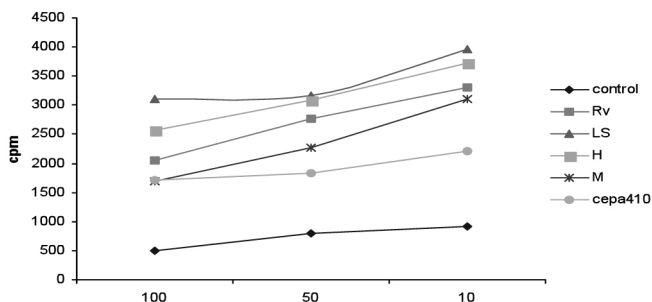
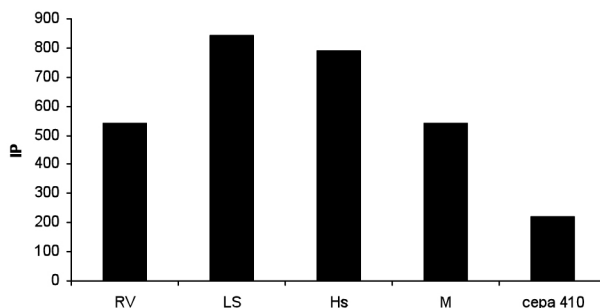


Figura 4 -B)



PBMC se aislaron de sangre de individuos sanos PPD+ por centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque. Las MoCD se obtuvieron incubando en placas de 6 wells las PBMC durante 2h en estufa con (10 ng/ml) GM-CSF, luego de lo cual se removieron las células no adherentes (*), se lavó la placa con SF tibia y se adicionó medio RPMI-1640 suplementado con SFB 10%, penicilina (100U/ml) streptomycin (100µg/ml) (medio completo, MC) con el agregado de GM-SCF (50 ng/ml) IL-4 (10ng/ml) cultivándose en estufa por 7 días. Luego las DC obtenidas a 5×10^5 DC/ml se cultivaron en placas de 24 wells en presencia de las cepas γ -irradiadas (1×10^8 bacilo/ml) en relación 2:1 Mtb:DC durante 48 h. Linfocitos Ly (*) se obtuvieron de la fracción no adherente, se lavaron y se dejaron en MC en estufa en concentraciones subóptimas de IL-2 hasta su empleo en ensayos de proliferación. A) Proliferación específica: DC estimuladas fueron cultivadas por 5 días con 1×10^5 linfocitos en relaciones de Ly:DC: 100:1, 50:1 y 10:1 en placa de 96 wells. B) Ensayo de proliferación mixta linfocitaria (MLR): DCs estimuladas fueron cultivadas por 5 días con 1×10^5 linfocitos heterólogos en la relación Ly:DC 10:1.

CONCLUSIONES

En este trabajo demostramos que los aislados clínicos de *Mtb* prevalentes en nuestro país, generan una respuesta inmune diferencial quizás asociada a una composición estructural característica de cada cepa. La cepa LAM indujo apoptosis y activación de PMN de manera similar a la cepa de referencia H37Rv mientras que los aislados clínicos del linaje Haarlem mostraron menor capacidad de activación medido por la expresión de CD11b y CD66b, en particular la cepa M. Además las cepas Haarlem no indujeron apoptosis de PMN. Demostramos que la cepa LAM es fagocitada por PMN en mayor medida que los demás aislados clínicos, generando una mayor producción de ROS.

Por otra parte observamos que todos los aislados clínicos de *Mtb* alteran el proceso de diferenciación in vitro de monocitos humanos de sangre periférica en forma similar a la cepa de referencia H37Rv, dando lugar a una población de células dendríticas con fenotipo alterado con patrón de expresión DCSIGN^{low}/CD86^{high} y CD1a^{low}/CD14^{high}.

Al evaluar la capacidad presentadora de las DC frente a los aislados clínicos de *Mtb*, observamos una capacidad diferencial de inducir proliferación de linfocitos autólogos y heterólogos, siendo las cepas M y 410 las que indujeron menor respuesta.

Estos resultados confirman que existen diferencias en cuanto a la respuesta inmune inducida entre aislados clínicos de *Mtb* debido quizás a variaciones en la pared bacteriana. Podríamos considerar dichas variaciones, como una estrategia de evasión de la micobacteria hacia la respuesta inmune innata y adaptativa generada por el huésped.

ABSTRACT

The outcome of tuberculosis pathogenesis was considered mainly related to the host but now it is becoming clear that bacterial factors are also involved in disease and latency. Variability of several genes involved in the virulence and pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) may be small but it may lead to large phenotypic differences. In Argentina a total of 11,464 new cases of tuberculosis (TB) were reported in 2006 being the prevalent *Mtb* lineages in Argentina: Latin America and Mediterranean (LAM) and Haarlem (H) with different immune responses between strains of Haarlem lineage. PMN are the first defensive cells recruited to tissue following infection, fight-

ing invading pathogens via mechanisms such as the generation of reactive oxygen species (ROS). We have previously reported that nonopsonized *Mtb* H37Rv is able to induce PMN apoptosis at a low *Mtb*:PMN ratio by a mechanism that involves the p38 MAPK pathway.

Here we evaluated the capability of the most prevalent *Mtb* strains in Argentina to induce PMN apoptosis compared with the broadly employed H37Rv reference strain. We assessed whether those differences in *Mtb* uptake and ROS production among strains may determine the PMN activation/apoptosis fate.

During a chronic infection such as TB, the pool of tissue dendritic cells (DC) must be renewed by recruitment of both circulating DC progenitors and monocytes (Mo). We have previously demonstrated that early interaction of H37Rv with Mo subverts DC differentiation in vitro. In this work we showed that clinical isolates have the same effect on Mo differentiation generating a DC-SIGN^{high}/CD86^{low} and CD1a^{low}/CD14^{high} phenotype. In addition, we evaluated DC as antigen presenting cells (APC) by performing a mixed lymphocyte reaction (MLR) and autologous lymphocytes specific proliferation for *Mtb* clinical isolates and we observed differences among strains, being LAM and Hs more effectiveness. These results led us to speculate that, some structural differences among strains could explain the characteristic innate immune response of each strain.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fenton, M.J. and M.W. Vermeulen 1996. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun*, 64(3): 683-90.
2. Holt, P.G. 2005. Pulmonary dendritic cells in local immunity to inert and pathogenic antigens in the respiratory tract. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2: 116-120.
3. Banchereau J, Steinman RM. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 393: 245-252.
4. Kaufmann SH. Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost. *Trends Immunol.* 2005 660-7. Epub 2005
5. Rusell DG. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat Rev Microbiol.* 2007 39-47.
6. Faurschou M, Borregaard N. 2003. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 5:1317-27.

7. Babior BM. 1984. Oxidants from phagocytes: Agents of defense and destruction. *Blood* 64:959–966.
8. World Health Organization. 1997. Global Tuberculosis Programme and International Union Against Tuberculosis and Lung Disease Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. WHO/TB/96.216. Geneva: The Organization.
9. Sasseti C.M, Boyd D, and Rubin E.J. 2001. Comprehensive identification of conditionally essential genes in mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:12712-12717.
10. Geffner L, Yokobori N, Basile J, Schierloh P, Balboa L, Romero MM, Ritacco V, Vescovo M, González Montaner P, Lopez B, Barrera L, Alemán M, Abbate E, Sasiain MC, de la Barrera S. 2009. Patients with multidrug-resistant tuberculosis display impaired Th1 responses and enhanced regulatory T-cell levels in response to an outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* H and Ra strains. *Infect Immun.* 77(11):5025-34.
11. Kaufmann SH. Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost. *Trends Immunol.* 26:660, 2005
12. Alemán M, de la Barrera S, Schierloh P, Yokobori N, Baldini M, Musella R, Abbate E, Sasiain M. 2007. Spontaneous or *Mycobacterium tuberculosis*-induced apoptotic neutrophils exert opposite effects on the dendritic cell-mediated immune response. *Eur J Immunol.* 37(6):1524-37.
13. Balboa L, Romero MM, Yokobori N, Schierloh P, Geffner L, Basile JI, Musella RM, Abbate E, de la Barrera S, Sasiain MC, Alemán M. 2010. *Mycobacterium tuberculosis* impairs dendritic cell response by altering CD1b, DC-SIGN and MR profile. *Immunol Cell Biol.*
14. Alemán M., García A., Saab, M. A., de la Barrera, S., Finiasz, M., Abbate, E. and Sasiain, M. C. 2002. *Mycobacterium tuberculosis*-induced activation accelerates apoptosis in peripheral blood neutrophils from patients with active tuberculosis. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 27: 583–592.
15. Alemán, M., Schierloh, P., de la Barrera, S., Musella, R. M., Saab, M. A., Baldini, M., Abbate, E. and Sasiain, M. C. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* triggers apoptosis in peripheral neutrophils involving TLR2 and p38-mitogen protein kinase in tuberculosis patients. *Infect. Immun.* 72: 5150–5158.
16. Perskvist, N., M. Long, O. Stendahl, and L. Zheng. 2002. *Mycobacterium tuberculosis* promotes apoptosis in human neutrophils by activating caspase-3 and altering expression of Bax/Bclx_L via an oxygen-dependent pathway. *J. Immunol.* 168:6358-6365.

17. Zu, Y.-L., Q. Jiafan, A. Gilchrist, G. A. Fernández, D. Vazquez-Abad, D. L. Kreutzer, C.-K Huang, and R.I. Sha'afi. 1998. p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for human neutrophil function triggered by TNF- α or FMLP stimulation. *J. Immunol.* 160: 1982-1989.



FACTORES GENÉTICOS PREDISPONENTES AL DESARROLLO DE ANTICUERPO INHIBIDOR DEL FACTOR VIII TERAPÉUTICO EN PACIENTES CON HEMOFILIA A.

Liliana Carmen Rossetti, Miguel Candela.

Instituto de Investigaciones Hematológicas *Mariano R Castex*.

Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires.

INTRODUCCIÓN

La Hemofilia es una enfermedad hemorrágica hereditaria, ligada al sexo, que afecta a 1 cada 5000 varones y se clasifica en 2 tipos indistinguibles clínicamente: la Hemofilia A (HA) debida defectos en gen del el factor VIII de coagulación (*F8*) y Hemofilia B (HB), en el factor IX (revisión en De Brasi et al, 2001). La HA puede sub-clasificarse según su severidad clínica y bioquímica en severa (se) (actividad FVIII menor al 1 IU/dl), moderada (mo) (entre 1 y 5 IU/dl) o leve (le) (entre 5 y 20 IU/d). La caracterización de la mutación causal constituye aún hoy un desafío en caso de HA debido al gran tamaño (186kb) y complejidad estructural (26 exones) del gen (Gitschier et al, 1984). La inversión del intrón 22 (Inv22) (Naylor et al, 1993; Lakich et al, 1993) y del intron 1 (Inv1) (Bagnall et al, 2002) son las únicas mutaciones recurrentes reconocibles, causando el 42% (Antonarakis et al, 1995; De Brasi et al, 2000) y el 2% (Rossetti et al, 2004a) de las seHAs, respectivamente. En todo el resto de las hemofilias (HA y HB) encontramos todo tipo de mutaciones incluyendo grandes y pequeñas delecciones o inserciones y mutaciones puntuales asociadas a cambios deletéreos tipo *missense*, *nonsense* y del *splicing*.

A diferencia de los afectados por otras enfermedades genéticas, los hemofílicos pueden ser tratados satisfactoriamente por sustitución intravenosa de los factores de la coagulación, permitiendo una expectativa de vida normal. Sin embargo, el desarrollo de anticuerpo inhibidor (IAb) del factor deficiente es la complicación más seria en la terapia de reemplazo aplicada en los pacientes con HA (y HB, aunque menos frecuentemente). En seHA los IAb aparecen en aproximadamente el 30% de los afectados, mientras que en seHB en el 5%. La terapia de pacientes con inhibidor suele generar problemas permanentes que afectan seriamente la salud y la calidad de vida, y requiere intervención en extremo costosa. Entre otros factores genéticos

y ambientales relacionados al desarrollo de inhibidor, la relación más fuerte que se ha encontrado es con el tipo de mutación causal: por ejemplo, grandes deleciones, mutaciones *nonsense* y grandes rearrreglos (inversiones), presentan de alto a moderado riesgo relativo de desarrollo de inhibidor, mientras que las mutaciones *missense*, pequeñas deleciones/inserciones y mutaciones que afectan el *splicing*, bajo riesgo. Sin embargo, algunos pacientes con mutaciones de alto riesgo no desarrollan inhibidor, poniendo en evidencia que aún faltan encontrar otros factores involucrados.

Con este estado del conocimiento, sumado al hecho que hemofílicos mellizos monocigóticos tienen siempre el mismo status de inhibidor (Oldenburg et al, 2006), se hace evidente la necesidad de hallar algún factor genético adicional. Estos factores, posiblemente estén involucrados en la regulación de la respuesta inmune. El gen CTLA4 ubicado en el cromosoma 2, codifica para una molécula coestimulante, cuya función es la regulación negativa de la proliferación de linfocitos T. Varios polimorfismos presentes en este gen han sido relacionados a distintas enfermedades autoinmunes, se ha observado que en DMID, el estímulo del sistema inmune que desencadena la autoinmunidad estaría mediado por algunas variantes alélicas ligadas al promotor CTLA4 (-318 C/T), a una región exónica codificante (49 A/G, que predice un cambio *missense* Thr17Ala), y a un microsatélite (STR, *short tandem repeat*) de la zona 3' no traducible. Los alelos subrayados determinan una menor expresión del gen CTLA4, una menor cantidad de proteína funcionante (Tre17) y un aumento en la producción de IL2 (*interleukin 2*) asociada a un mayor número de repeticiones del microsatélite, respectivamente. Recientemente, fueron encontrados 2 factores predisponentes al desarrollo de inhibidor asociados a polimorfismos en genes involucrados en la respuesta inmune: (1) en el gen del TNF α (*tumor necrosis factor- α*), c.G-308A (donde G corresponde a alto riesgo) (Asternak et al, 2006a), y en el gen de IL10 (*interleukin 10*), el alelo de 134 bp del microsatélite (CA)_n, (Asternak et al, 2006b).

Además de la utilidad relacionada al riesgo a desarrollar inhibidor y la valiosa información para el médico hematólogo tratante de la hemofilia que pueden resultar de estos estudios de correlación genotipo/inhibidor; la caracterización del tipo y localización molecular de la mutación causal de la hemofilia, constituye la ruta ideal para proveer información para asesorar genéticamente a las familias afectadas (diagnóstico de portadoras) y también es una oportunidad única para investigar directamente el mecanismo que originó el defecto genético.

Con el objetivo de determinar los factores genéticos que predisponen al desarrollo de anticuerpo inhibidor de la terapia sustitutiva del factor ausente en hemofilia, en este trabajo se abordó la caracterización completa la mutación causal en 102 pacientes Argentinos con HA severa, se compilaron los datos clínicos para su correlación estadística y también se investigó el genotipo polimórfico sobre tres genes previamente involucrados en diversas enfermedades de etiología autoinmunitaria, IL10, TNFA y CTLA4.

MATERIALES Y MÉTODOS

Poblaciones y muestras estudiadas

Se estudiaron 102 muestras de pacientes con hemofilia severa. También fueron estudiados muestras de miembros de estas familias y muestras de individuos control de la población Argentina general (descrita en De Brasi et al, 2003, Haematologica 88:232-4).

El DNA genómico fue obtenido a partir de leucocitos de sangre periférica por extracción en fenol-cloroformo o *salting out* y precipitación alcohólica. La concentración, calidad y pureza de las muestras de DNA fueron evaluadas por electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría UV (260/280 nm).

Algoritmo de análisis molecular en el F8:

La inversión del intrón 22 del gen del FVIII (*F8*), (*Inv22*) fue estudiada en primera línea en HA severa (FVIII:C <1%) por el método de inverse shifting-PCR (IS-PCR). Este método ha sido diseñado recientemente en nuestro laboratorio (Radic-Rossetti et al, 2008 J Thromb Haemost 6: 830-6) y permite la discriminación de patrones con diagnóstico molecular de la *Inv22* tipo 1 y tipo 2, así como la detección de las deleciones y duplicaciones asociadas a *int22h* (*Del22* y *Dup22*) lo cual hasta el presente sólo era posible mediante el análisis de Southern blot (Lakich et al, 1993). Brevemente, IS-PCR incluye: (1) la restricción con *BclI* de las muestras de DNA genómico, (2) la ligación en gran volumen (400ul) de los fragmentos *BclI* (autoligación) para obtener círculos-B y (3) el análisis de los círculos-B por 2 pruebas PCR estándar: prueba diagnóstica (*primers* ID con IU, 2U y 3U) y complementaria (*primers* ED con IU, 2U y 3U).

La inversión del intrón 1 del *F8*, (*Inv1*) fue estudiada por IS-PCR, sobre el mismo sustrato ya preparado para investigar la *Inv22* en aquellos pacientes con HA severa que resultaron no informativos para la *Inv22* (Radic-Rossetti et al, 2008 J Thromb Haemost 6: 830-6). Este procedimiento reemplaza a la

clásica técnica de doble PCR para investigar a la Inv1 (Bagnall et al, 2002). Básicamente, se realiza un ensayo PCR adicional de los círculos-B: Inv1 prueba diagnóstica (*primers* 1-ID con 1-IU y 1-ED).

En casos de HA, todavía no informativos se realizó un *screening* primario o *prescreening*. Todas las secuencias exónicas relevantes del *F8* (26 exones y consensos asociados al *splicing*) fueron amplificadas por PCR en 37 amplímeros, cuyos tamaños y diseño de *primers* se realizó con el objetivo de someterlos al método de *screening* de mutaciones pequeñas elegido, CSGE (*conformation sensitive gel electrophoresis*). La identidad y tamaño de estos amplímeros fue analizada por electroforesis en gel de agarosa (1,5%). En este contexto, las delecciones grandes son definidas como la ausencia repetida (por lo menos en 3 ensayos de PCR independientes) y consistente de un grupo de secuencias exón-específicas contiguas.

Después de la detección de grandes delecciones fue abordado el *screening* de mutaciones pequeñas (pequeñas ins/del y sustituciones de 1 nucleótido) mediante CSGE. Los amplímeros del *F8* son electroforetados como fue descripto (Rossetti et al, 2007 Haematologica 92: 842-845). Brevemente, los amplímeros de muestras clínicas y controles no-mutados son mezclados para formar heterodúplex y electroforetados por 17 hs, a 400V, en geles de poliacrilamida al 12% (99:1, acrilamida:bisacrilamida) en condiciones medianamente desnaturalizantes (10% etilen glicol, 15% formamida deionizada) de alta resolución (41x33x 0.08cm).

Los productos PCR indicados como anómalos por CSGE (exhibiendo un patrón diferente al control), son purificados por cromatografía en columna usando *Concert Gel Extraction System* (Gibco BRL) o similar; y sometidos a secuenciación de DNA automática-fluorescente.

Para determinar si el cambio genético encontrado corresponde a la mutación causal de la hemofilia se aplican los criterios internacionales vigentes.

Análisis del polimorfismo CA repeat en el promotor del gen IL10:

La determinación de los alelos del microsatélite o STR (*short tandem repeat*) del dinucleótido CA (CA_n) de la región promotora del gen IL10 se realizó por la técnica de amplificación PCR radiactiva y electroforesis desnaturante o, alternativamente, por electroforesis no-desnaturante y tinción con plata coloidal. La presencia del alelo de 19 repeticiones CA, definido por el tamaño molecular del amplímero de 134 bp, se obtiene con los *primers*: IL10.1, GTCCTTCCCCAGGTAGAGCAACTCC y IL10.2, TTCCCAAAGAAGCCTTAGTAGTGTG (Eksdale et al, 1995, Immunogenet 42:444-5). Bási-

camente, se marcaron 3 pmol del primer IL10.1 con γ -P³²ATP y T4-polinucleótido kinasa durante 30 min a 37°C. La reacción PCR se realiza sobre 150 ng de DNA templado, en 2,5 mM de Cl₂Mg, con 3 pmoles del primer marcado e IL10.2 en 15 μ l de volumen final. Condiciones del ciclado: 5 min a 94°C, y 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 60°C, 30 seg a 72°C, y 6 min. de extensión final a 72°C. El análisis del genotipo se realiza por autorradiografía de la electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% en condiciones desnaturizantes, el gel fue secado y autorradiografiado.

Alternativamente, como una mejora técnica significativa para el funcionamiento del laboratorio, el producto PCR frío (no-radioactivo) fue analizado por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% de alta resolución (40 cm de longitud) en condiciones no desnaturizantes y tinción con plata coloidal.

Análisis del dimorfismo del promotor de CTLA4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4):

El análisis del dimorfismo [C/T] en la región promotora (posición c.-318) del gen *CTLA4* fue realizado por PCR bajo condiciones estándar (*primers* CTLfw AAATGAATTGGACTGGATGGT y CTLrv

TTACGAGAAAGGAAGCCGTG) seguido de análisis de restricción con la enzima MseI (T*TAA). El amplímero de 247 bp es clivado en dos segmentos de 226bp y 21bp (control de digestión para MseI) cuando el alelo [C] o [-] está presente y en tres segmentos de 132bp, 93bp y 21bp cuando el alelo [T] o [+]. Los resultados se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (adaptación de Deichmann et al, 1996, Biochem Biophys Res Comm 225:817-8).

Análisis del dimorfismo del promotor de TNF α (tumor necrosis factor- α):

El análisis del dimorfismo [G/A] en la región promotora (posición c.-308) del gen *TNF α* por PCR estándar (*primers* A1 AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT, la base subrayada modifica la secuencia salvaje para introducir un sitio de restricción de la enzima NcoI, y A2 TCCTCCCTGCTCCGATTC-CG). El producto amplificado es analizado por restricción con la enzima NcoI (C*CATGG). El amplímero de 107bp es clivado en dos segmentos de 86bp y 20bp por NcoI cuando el alelo [G] o [+] está presente, pero no es clivado cuando el alelo [A] o [-] está presente. Los resultados se investigan por electroforesis en gel de agarosa al 3% o en gel de poliacrilamida al 9% no desnaturizante de baja resolución (adaptación de Wilson et al, 1992, Hum Mol Genet 1:353).

Análisis Estadístico

Las pruebas de hipótesis estadísticas utilizadas incluyeron Chi cuadrado con la corrección de Yates y Fisher exacto aplicadas a nuestras tablas de contingencia mediante el software GraphPad Prism 4.0. Las tablas de contingencia fueron realizadas con las mutaciones causales de hemofilia y los genotipos de los polimorfismos de los genes IL10 (alelo 134bp presente en heterocigosis 134/* o ausente, **), TNFA (composición alélica G/G, G/A o A/A) y CTLA4 (composición alélica C/C, C/T o T/T).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Distribución de Mutaciones e Inhibidor en pacientes con Hemofilia A severa

En el presente estudio, se caracterizó la mutación causal en un grupo de 102 pacientes. Se observó desarrollo de inhibidor en 31/102 pacientes con HA severa, correspondiendo a un 30% de los casos. Se estimó la frecuencia de cada tipo de mutación y también los riesgos relativos a desarrollar inhibidor en cada grupo definido por un tipo y ubicación de la mutación en la molécula de FVIII madura. Las frecuencias y riesgos de inhibidor de cada grupo de mutaciones se muestran en la Tabla 1 y en la Figura 1. Se observó una asociación significativa (S^{**}) entre el tipo de mutación y la propensión a desarrollar inhibidor ($p=0.01$).

Tipo de mutación/ Localización	Gran delección >1exón	Nonsense cadena liviana	Defecto de <i>splicing</i>	<i>Frameshift</i> ins/del	Gran delección =1exón	Nonsense cadena pesada	Inv22	Inframe ins/del	Inv1	<i>Missense</i>	Total
Inhibidor [+]	5/6(83%)	4/8(50%)	1/3	6/18(33%)	0/2	2/4	13/47 (28%)	0/1	0/2	0/11(0%)	31(30%)
Grupo de Riesgo de mutación- inhibidor	Alto riesgo 9/14(64%)		Riesgo intermedio 22/74(30%)					Bajo riesgo 0/14(0%)			

Tabla 1: Distribución del tipo y ubicación en el *F8* de la mutación causal en pacientes con HA severa con inhibidor positivo (de alta y baja respuesta) y sin inhibidor (ausente o transientes).

En resumen, desarrollaron inhibidores permanentes 31 (30%) pacientes de un total de 102 con HA severa.

En el grupo de **alto riesgo** (64%, 9/14): 5 de 6 (83%) pacientes con deleciones de más de 1 exón y 4 de 8 (50%) con defectos *nonsense* en la cadena liviana del FVIII.

Con **riesgo intermedio** (30%, 22/74): 1 de 3 con defectos de *splicing*, 6 de 18 (33%) con *frameshift-ins/del*, 0 de 2 con deleciones de 1 exón, 13 de 47 (28%) con la Inv22, 2 de 4 con *nonsense* en la cadena pesada del FVIII.

Con **riesgo bajo** (0%, 0/14): ningún paciente de 2 con la Inv1, de 1 con *in-frame-ins/del* o de 11 con defectos *missense*. (Tabla 1).

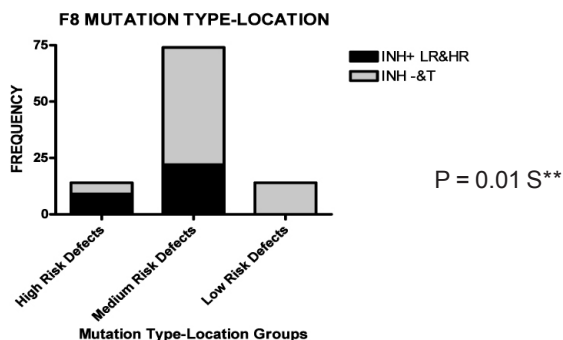


Figura 1. Distribución del tipo y ubicación en el F8 de la mutación causal en pacientes con HA severa con inhibidor positivo de alta y baja respuesta (INH+ LR&HR) y sin inhibidor (ausente o transientes, - & T) distribuidos en 3 grupos de riesgo (Alto-Medio-Bajo), respecto al riesgo relativo de desarrollo de anticuerpo inhibidor.

Polimorfismos en los genes de IL10, TNFA y CTLA4 e Inhibidor

Se analizó la asociación de variantes alélicas de tres polimorfismos potencialmente modificadores del riesgo a desarrollar inhibidor por estar involucrados en la respuesta inmune: IL10 (*interleukin 10*) (microsatélite CA-repeat, CA₁₀: alto riesgo), TNFA (*tumor necrosis factor-α*) (dimorfismo -308 G/A, A: alto riesgo y CTLA4 (dimorfismo -318 C/T, T: alto riesgo).

IL10:

Para el microsatélite del promotor de IL10, se estudiaron 102 pacientes (204 alelos) con HA severa (Figura 2). No se halló asociación estadística de las variables en las tablas de contingencia.

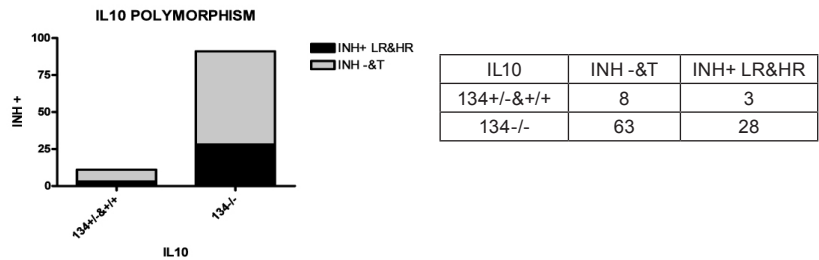


Figura 2: Distribución del alelo IL10 CA19 (134bp) en pacientes con HA severa con y sin inhibidor.

TNFA:

Para el dimorfismo G/A de la posición -308 del gen TNF α se estudió el mismo grupo de 102 pacientes (204 alelos) con HA severa (Figura 3). En este análisis tampoco se detectó una asociación estadísticamente significativa de las variables genotipo TNFA y desarrollo de inhibidor.

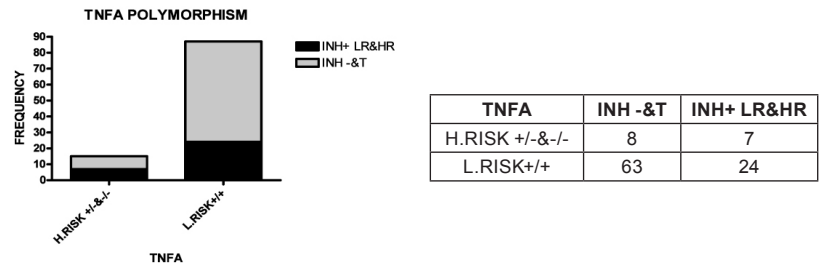


Figura 3: Distribución del alelo TNFA -308 A en pacientes con HA severa con y sin inhibidor.

CTLA4:

También se analizó en el mismo grupo de pacientes con HA severa (Figura 4) el dimorfismo -318 C / T del gen CTLA4 y todos ellos resultaron homocigotas C / C. En este análisis tampoco se detectó una asociación estadísticamente significativa.

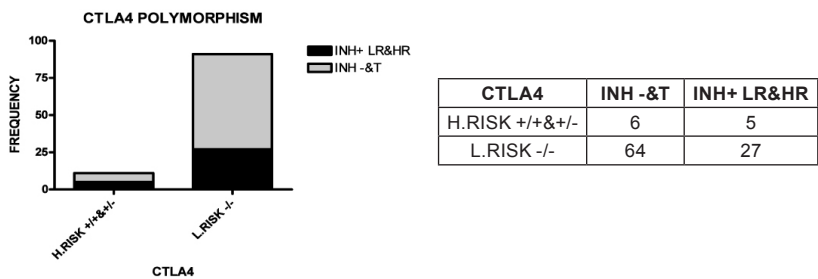


Figura 4: Distribución del alelo CTLA4 -318 T en pacientes con HA severa con y sin inhibidor.

IL10 – TNFA - CTLA4:

También se estudiaron los 3 polimorfismos en conjunto, teniendo en cuenta los alelos de riesgo de cada uno, y no se hallaron diferencias estadísticas significativas (Figura 5).

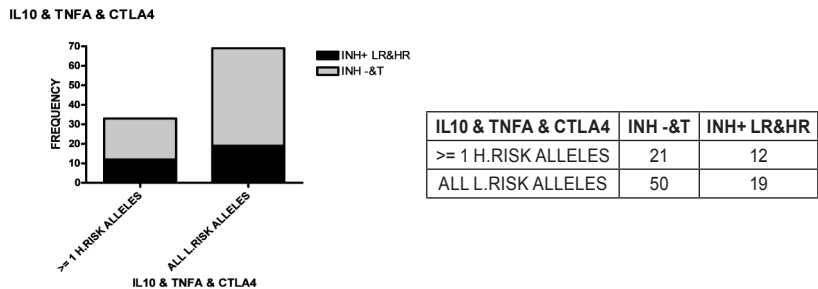


Figura 5: Distribución de los alelos de riesgo conjunto de los polimorfismos en IL10-TNFA-CTLA4 en pacientes con HA severa con y sin inhibidor.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados permiten determinar en nuestra población que el tipo y ubicación de la mutación causal de hemofilia en el *F8* es el factor genético más influyente para el desarrollo de inhibidor. Se destacan como mutaciones de alto riesgo las deleciones de más de un exón y las mutaciones *nonsense* en la cadena liviana; mientras que las mutaciones *missense*, la *Inv1* y las *in-frame-ins/del* expresan bajo riesgo.

En nuestra población, a diferencia de los datos observados en la literatura, no hemos podido confirmar la asociación reportada entre la propensión al desarrollo de inhibidor y los polimorfismos analizados en los genes *IL10*, *TNFα* o *CTLA4*.

RESUMEN

La hemofilia A (HA) es una coagulopatía hereditaria ligada al X que afecta 1:5000 varones causada por mutaciones deletéreas en el gen del *FVIII* (*F8*). La sustitución del factor ausente permite tratar al hemofílico con eficacia. Sin embargo, el desarrollo de inhibidor del *FVIII* terapéutico torna inefectiva la terapia afectando al 20-30% de los pacientes con HA severa. El desarrollo de inhibidor en hemofilia es considerado un rasgo multifactorial, involucrando factores genéticos y ambientales.

Este trabajo tuvo como objetivo caracterizar factores genéticos que predisponen a desarrollar inhibidor.

Se identificó la mutación causal en 102 pacientes con HA severa por aplicación de un algoritmo de análisis del *F8* establecido en la Argentina. También fueron estudiados tres polimorfismos potencialmente modificadores del riesgo a desarrollar inhibidor: *IL10* (*interleukin 10*) (*CA-repeat*, *CA*₁₉;134 pb alto riesgo), *TNFA* (*tumor necrosis factor-α*) (-308 G/A, A: alto riesgo) y *CTLA4* (-318 C/T, T: alto riesgo).

Desarrollaron inhibidor 32 pacientes con HA severa (31%). Observamos en el grupo de alto riesgo de inhibidor (64%, 9/14): deleciones de más de 1 exón (83%, 5/6) y defectos *nonsense* en la cadena liviana del *FVIII* (50%, 4/8); en el grupo de riesgo intermedio (30%, 22/74): defectos *nonsense* en la cadena pesada del *FVIII* (2/4), *frameshift-ins/del* (33%, 6/18), la *Inv22* (28%, 13/47), defectos de *splicing* (1/3) y deleciones de 1 exón (0/2), y en el grupo de bajo riesgo (0/14): *in-frame-ins/del* (0/1), la *Inv1* (0/2) y defectos *missense* (0%, 0/11).

En contraste con un estudio europeo, no se observaron asociaciones estadísticas entre los alelos de riesgo de los polimorfismos de IL10, CTLA4 y TNFA ni por separado ni cuando fueron considerados en conjunto; con el riesgo a desarrollar inhibidor.

En conclusión, nuestros resultados permitieron determinar en nuestra población que el tipo y ubicación de la mutación causal de hemofilia en el *F8* es el factor genético más influyente para desarrollar inhibidor.

ABSTRACT

Hemophilia A (HA) is an X-linked bleeding disorder affecting 1 in 5,000 males in all human populations associated with deleterious mutations in the coagulation factor VIII (*F8*) gene. The development of inhibitory antibodies is a serious complication that occurs in 20-30% of patients with HA in response to replacement therapy with the deficient factor. The inhibitor development is considered a multifactor risk involving both, genetic and environmental factors.

This study characterizes all hemophilia causative mutations and associated polymorphisms in the Argentinean population, associated with the development of inhibitor antibody. The causative mutation was identified in 102 HA severe affected patients by using an algorithm for the complete analysis of the *F8* gene designed in Argentina. Three polymorphisms potentially associated with inhibitor development also were studied: IL10 (*interleukin 10*) (CA-repeat, CA₁₉::134 pb high risk), TNFA (*tumor necrosis factor-α*) (-308 G/A, A: high risk) y CTLA4 (-318 C/T, T: high risk).

Thirty two patients showed inhibitor (31%). We observed inhibitor development in 64% (9/14) in the high risk group: large deletions > 1 exon (83%, 5/6) and nonsense defects in the light chain of the *F8* (50, 4/8); in the intermediate risk group (30%, 22/74): *nonsense* defects in the heavy chain of the *F8* (2/4), *frameshift-ins/del* (33%, 6/18), the Inv22 (28%, 13/47), *splicing* mutations (1/3) and 1 exon deletions (0/2), and in the low risk group (0/14): *in-frame-ins/del* (0/1), the Inv1 (0/2) and *missense* mutations (0%, 0/11).

In contrast with a North European study, no statistic association was found between the risk polymorphic alleles in IL10, CTLA4 and TNFA.

In conclusion, our results allow suggest in our population that the type and location of the causative mutation of hemophilia in the *F8* is the more influent factor in the development of inhibitor.

REFERENCIAS

1. Antonarakis SE, and a consortium of more than 50 international authors. FVIII gene inversions in severe haemophilia A: results of an international consortium study. *Blood* 1995; 86: 2206-2212.
2. Astermark J, Oldenburg J, Escobar M, White GC, Astermark J, Oldenburg J, Escobar M, White GC 2nd, Berntorp E; Malmö International Brother Study study group. The Malmö International Brother Study (MIBS). Genetic defects and inhibitor development in siblings with severe hemophilia A. *Haematologica*. 2005 Jul;90(7):924-31.
3. Astermark et al. 2006a. Polymorphisms in the TNFA and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* 108: 3739-45.
4. Astermark et al. 2006b. Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* 107: 3167-72.
5. Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is aquent cause of severe Hemophilia A. *Blood* 2002; 99:168-174.
6. De Brasi CD, Candela M, Cermelj M, Slavutsky IR, Larripa IB, Perez Bianco R, Tezanos Pinto M. Intron 22 factor VIII gene inversions in Argentine families with severe haemophilia A. *Haemophilia* 2000; 6: 21-22.
7. De Brasi CD, Larripa IB, Pérez Bianco R. Hemofilias. Capítulo 4: "Genética de la Hemofilia A y B". Editorial Prado SA, Tehuantepec, Méjico. 2001. ISBN 968-6899-33-2. pp: 55-66.
8. Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 1984; 312: 326-345.
9. Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE & Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are common cause of severe Haemophilia A. *Nature Genetics* 1993; 5: 236-241.
10. Naylor J, Brinke A, Hassock S, Green PM, Giannelli F Characteristic mRNA abnormality found in half the patiens with severe Haemophilia A is due to large inversions. *Hum Molec Genet* 1993; 2: 1773-1778.
11. Oldenburg et al. 2006. Genetic Risk factors for Inhibitor to factors VIII and IX. *Haemophilia* 12: 15-22.
12. Rossetti LC, Candela M, Perez Bianco R, Tezanos Pinto M, Western A, Goodeve A, Larripa IB, De Brasi CD. Analysis of FVIII gene intron 1 inver-

- sion in Argentinean families with severe haemophilia A and a review of the literature. *Blood Coagul Fibrinol* 2004; 15: 569-572.
13. Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasi CD. Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the factor VIII gene. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 830–836.
 14. Rossetti et al. 2004a. Analysis of FVIII gene intron 1 inversion in Argentinean families with severe Haemophilia A and a review of the literature. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 15: 569-572
 15. Rossetti et al. 2004b. Homeologous Recombination between AluSx-Sequences as a Cause of Hemophilia. *Human Mutation* 24: 440.



ESTUDIO DEL PERFIL INMUNOLÓGICO DURANTE EL CRECIMIENTO DE UN TUMOR DE MAMA TRANSPLANTABLE EN UNA LÍNEA ENDOCRIADA DE RATÓN SELECCIONADO POR CONFORMACIÓN CORPORAL

Dra. Viviana Rosa Rozados; Dr. Di Masso Ricardo José, Dr. Zacarías Fluck Mariano, Dra. Scharovsky Olga Graciela, Dra. Rico María José.

Alumnos colaboradores: Cáceres Juan Manuel, Pagura Lucas.

Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe 3100, (2000) Rosario (Santa Fe), Tel: (0341) 480-4558/63 (Int: 244), Fax: (0341) 480-4569, E-mail: viviana.rozados@gmail.com

Los modelos animales han sido clave para el estudio de los mecanismos moleculares y el desarrollo de nuevas terapias en cáncer. Las líneas de ratón endocriadas CBi⁻ y CBi/L que fueron generadas por selección artificial a partir de una población CBi del Instituto de Genética Experimental de la Facultad de Ciencias Médicas, UNR y el adenocarcinoma de mama M-406 (M-406) que surgió en forma espontánea en la línea CBi, constituyen un modelo para estudiar la "Teoría de la inmuniedición tumoral", escape (**ES**), equilibrio (**EQ**) y eliminación (**EL**).

En este trabajo se evaluó el comportamiento del M-406, inoculado en forma subcutáneas en las líneas endocriadas CBi FS, CBi⁻ FS y CBi/L FS (generadas a partir de las líneas CBi, CBi⁻ y CBi/L por apareamiento hermano con hermano, respectivamente). Se determinó el volumen tumoral midiendo con calibre tres veces por semana y en los animales en que el tumor creció se ajustó dicho volumen a una ecuación de crecimiento exponencial, a partir de la cual es posible calcular el tiempo de duplicación.

En todas las líneas CBi FS, CBi⁻ FS y CBi/L FS se observó 100% de toma. En CBi FS, el tumor creció en forma exponencial hasta el volumen máximo permitido por las normas éticas (Fig 1). En CBi⁻ FS el tumor fue eliminado en el 100% de los animales (Fig 2) y en la línea CBi/L FS el tumor creció inicialmente en todos los animales (**ES**), en el 51,3% (Fig 3a) hasta alcanzar el volumen máximo permitido, en el 30,0% el tumor fue eliminado (**EL**) (Fig 3b) y en el 18,7 % presentó un estado de equilibrio (**EQ**) (Fig 3c). En CBi FS y CBi⁻ FS el comportamiento tumoral es homogéneo, lo cual condice con su condición de líneas de máxima endogamia, en cambio CBi/L FS, el comportamiento tumoral es heterogéneo.

El proceso de selección y la respuesta correlacionada a la misma, así como los efectos no direccionales de la endocría y la deriva genética sugieren que estas líneas han fijado distintas combinaciones alélicas, lo que explicaría el comportamiento homogéneo pero diferente, que se observa en las líneas CBI FS y CBI⁻ FS.

Figura 1. Crecimiento del adenocarcinoma de mama M-406 en la línea de ratón CBI FS

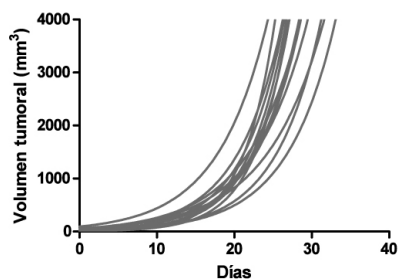


Figura 2. Crecimiento del adenocarcinoma de mama M-406 en la línea de ratón CBI⁻ FS

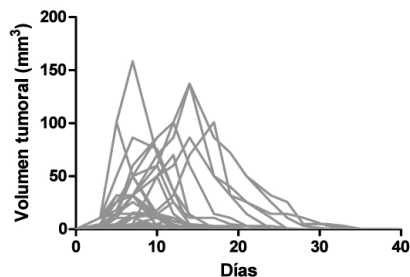
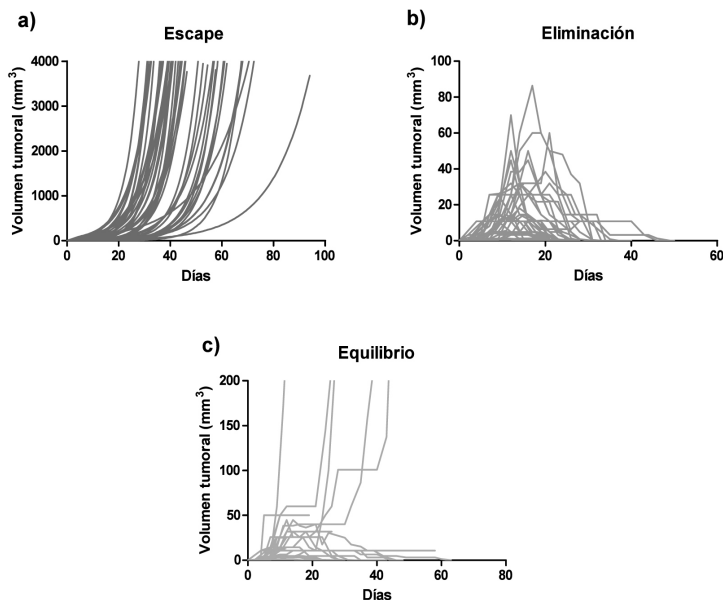
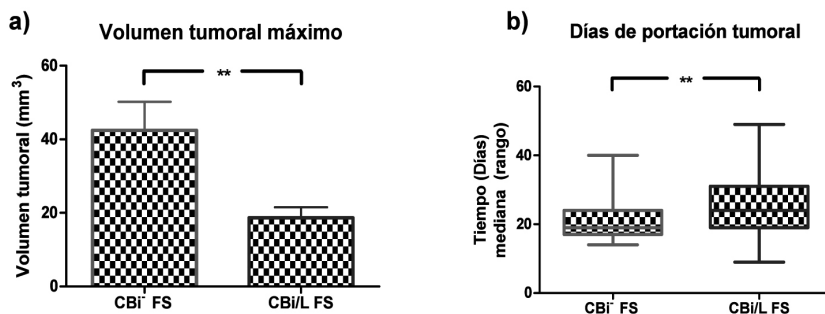


Figura 3. Crecimiento del adenocarcinoma de mama M-406 en la línea de ratón CBi/L FS

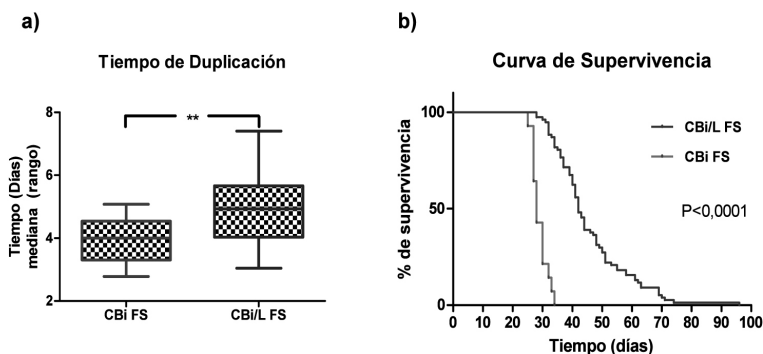
Caracterización el crecimiento de M-406 en las distintas líneas de ratón

Equilibrio: la condición de **EQ** sólo se observó en los animales de la línea CBi/L FS y se caracterizó por mantener el volumen tumoral ($37,6 \pm 14,70 \text{ mm}^3$ (media $\pm$ EE) por un período de aproximadamente 10 días.

Eliminación: se observó en las líneas CBi/L FS y CBi⁻ FS. En la línea CBi/L FS tarda más tiempo en rechazar el tumor que la línea CBi⁻ FS lo que se puede observar a través del volumen tumoral máximo alcanzado: $42,5 \pm 7,73 \text{ mm}^3$ (media $\pm$ EE) y $18,7 \pm 2,86 \text{ mm}^3$ (media $\pm$ EE) respectivamente ($P=0,0023$) (Fig 4a), así como también a través de la diferencia en los tiempos de portación tumoral: CBi⁻ FS, 19 (14-40) y CBi/L FS, 24 (9-49) días (mediana; rango) ($P=0,0019$) (Fig 4b).

Figura 4. Características del crecimiento tumoral en CBi- FS y CBi/L FS en eliminación

Escape: Esta fase se presentó en las líneas CBi FS y CBi/L FS. El tiempo de duplicación del M-406 en CBi FS fue significativamente menor que en CBi/L FS [4,00 (2,78-5,08) vs 4,94 (3,04-7,40)] (mediana; rango) días, respectivamente, ($P=0,0014$). (Fig 5a). La supervivencia fue mayor para la línea CBi/L FS, [42 (28-96)] (mediana; rango) días, que para la línea CBi FS, [28 (25-34)] días, ($P<0,0001$) (Fig 5b). Estos resultados permitieron concluir que la velocidad de crecimiento tumoral es más lenta en CBi/L FS en fase de escape que en CBi FS.

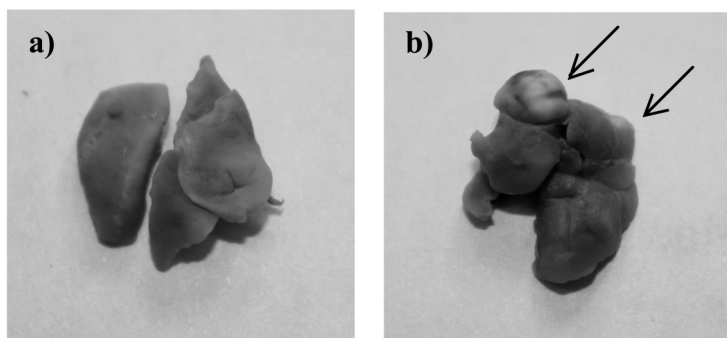
Figura 5. Características del crecimiento tumoral en CBi FS y CBi/L FS en escape

Tanto en el proceso de escape como el de eliminación son más lentos en la línea CBi/L FS que en las líneas CBi FS y CBi⁻ FS. Como podemos observar el modelo exponencial creciente permite la caracterización cuantitativa del crecimiento de tumores y puede ser usado como una herramienta con fines pronósticos y para cuantificar efectos terapéuticos en diferentes modalidades de tratamiento¹.

Presencia o ausencia de metástasis pulmonares

Sólo presentaron metástasis pulmonares las líneas en **ES** un 17% en CBi FS y 58% en CBi/L FS. Esta diferencia se puede explicar por el crecimiento más lento que se presenta en la línea CBi FS que en CBi/L FS.

Figura 6. Pulmones de animales CBi/L FS en escape



a) Pulmón sin metástasis b) Pulmón con metástasis

Determinación de citoquinas séricas

La respuesta Th1 está asociada con la eliminación tumoral, mientras que la respuesta Th2 se asocia con la progresión tumoral. Con el fin de caracterizar las distintas fases de crecimiento en la línea CBi/L FS, **EQ**, **ES** y **EI**, se determinó los niveles séricos de las citoquinas Th1: IL-2, INF- γ y Th2: IL-4 e IL-10.

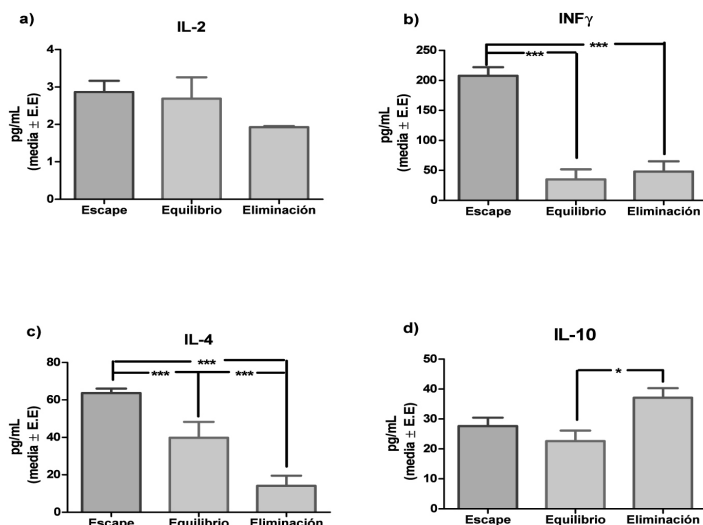
En este modelo, (Fig. 8a) los niveles de IL-2 no mostraron diferencias significativas entre los diferentes estadios, indicando que dicha citoquina no cumpliría un rol determinante en el tipo de respuesta inmune desarrollada. Si se observó diferencias en los niveles de INF- γ que fueron mayores en **ES**, comparado con **EQ** o **EL**.

($P < 0,0001$) (Fig. 8b). Si bien estos resultados no concuerdan con la función antitumoral clásica de esta citoquina, se ha visto que el INF- γ es también capaz de cumplir un rol regulatorio^{2, 3}.

La respuesta Th2 suele estar asociada con el desarrollo tumoral. Existen estudios que demuestran que ratones deficientes para IL-4 desarrollan una respuesta Th2 muy reducida⁴. La concentración sérica de IL-4 difirió significativamente entre todos los grupos siendo: **EL** ($8,33 \pm 0,43$ pg/mL) < **EQ** ($39,78 \pm 8,45$ pg/mL) < **ES** ($65,30 \pm 0,94$ pg/mL) ($P < 0,001$) (Fig. 8c) lo que nos estaría señalando una posible actividad inmunosupresora de IL-4.

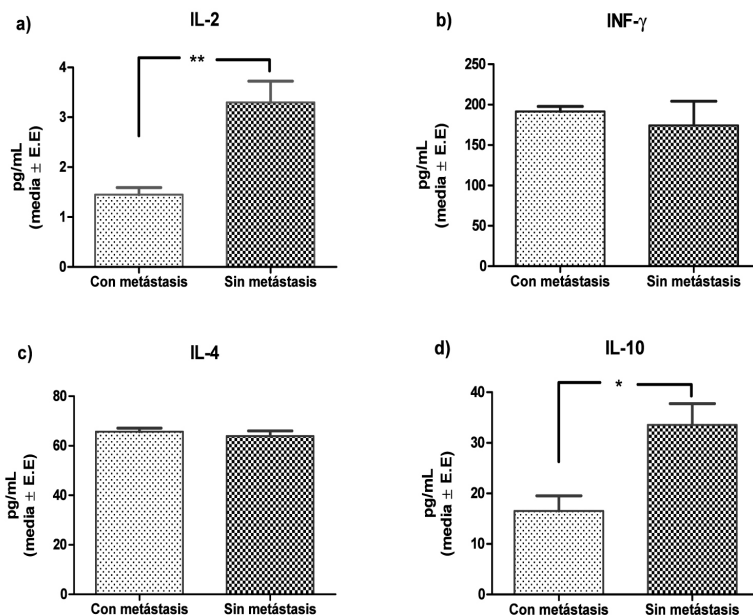
Contrariamente a la función inmunosupresora originalmente atribuida a la IL-10, los niveles séricos de esta citoquina, en este modelo, fueron mayores en los animales en **EL** ($37,12 \pm 3,19$ pg/mL) comparado con **EQ** ($22,59 \pm 3,51$ pg/mL) ($P < 0,05$) (Fig. 8d). Coincidiendo con estos resultados, tanto MacNeil y *col.* como Chen y *col.* observaron que IL-10 podría funcionar como un factor de diferenciación y crecimiento hacia la subpoblación de linfocitos CD8⁺, lo que indicaría una función inmunoestimulante de esta citoquina⁵.

Figura 7. Nivel sérico de citoquinas en las tres fases de crecimiento tumoral de la línea CBI/L FS



Los niveles INF- γ y de IL-4 no mostraron diferencias (Fig. 9b y 9c) entre los animales que con y sin metástasis pulmonares, en la línea CBi/L FS en **ES**. Los niveles de IL-2 encontrados en los animales sin metástasis pulmonares fueron mayores ($P=0,0033$) que aquellos niveles encontrados en los animales que desarrollaron metástasis (Fig. 9a). Los animales que no presentaron metástasis pulmonares tuvieron niveles aumentados de IL-10 ($P=0,0122$) (Fig. 9d). Se vio que esta citoquina es capaz de inhibir el desarrollo de metástasis por medio de las células NK, tanto en tumores espontáneos como en tumores inducidos⁶

Figura 8. Nivel sérico de las citoquinas en la línea CBi/L FS en escape con presencia o ausencia de metástasis



Proliferación tumoral en medios condicionados de células mononucleares

Los estudios *in vitro* en los que se evaluó la proliferación tumoral en medios condicionados (MC) de 24 y 48h preparados a partir células mononu-

cleares (MO) provenientes de animales CBI FS, CBI⁻ FS y CBI/L FS *naïve* y portadores de tumores en los diferentes fases de crecimiento tumoral, mostraron un comportamiento que se correlaciona con lo observado *in vivo*. Las células M-406 proliferaron significativamente más cuando fueron cultivadas en MC de MO de animales de las líneas CBI FS y CBI/L FS, en comparación con el grupo Control ($P=0,048$), lo que sugiere que dichas células serían capaces de liberar factores que estimulan la proliferación de las células tumorales. A su vez, las células M-406 proliferaron de forma diferente en los MC de 48h. Se observó una mayor proliferación cuando fueron cultivadas en MC de MO del genotipo CBI FS *naïve*, seguido de CBI/L FS *naïve* y la menor proliferación de presentó cuando células M-406 fueron cultivadas en el MC de MO proveniente de CBI⁻FS *naïve* ($P=0,0044$). (Fig 10 y 11).

Figura 10. Proliferación de M-406 en medios condicionados de 24 y 48h: por línea

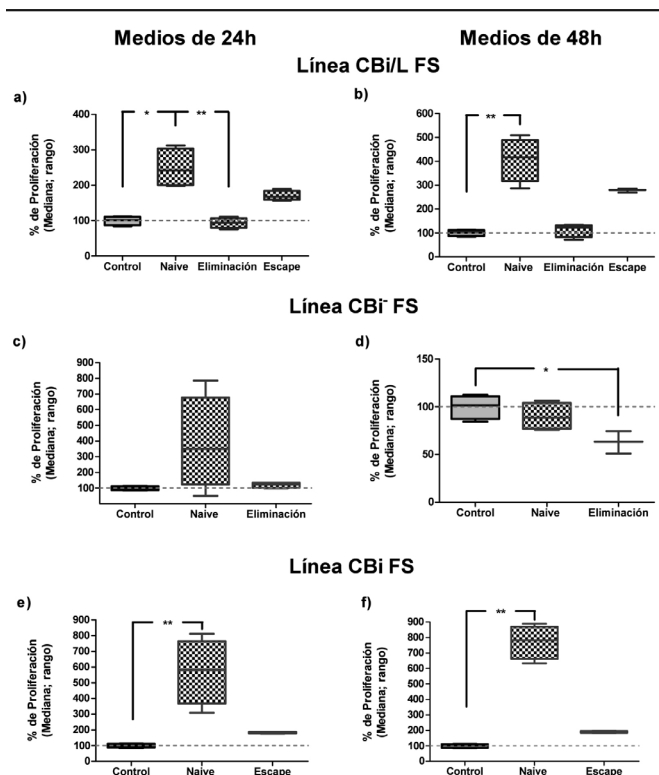
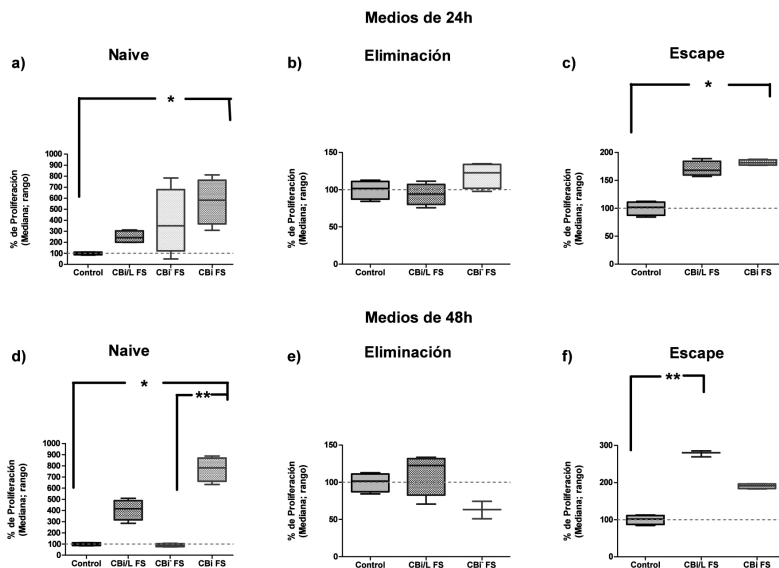
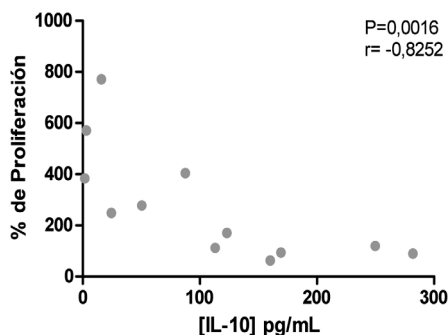


Figura 11. Proliferación de M-406 en medios condicionados
Por condición de crecimiento tumoral



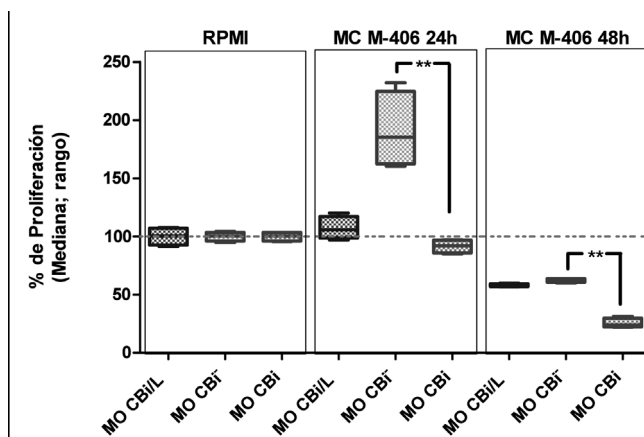
Correlación entre la concentración de citoquinas en los medios condicionados y el porcentaje de proliferación celular

Al medir el nivel de las diferentes citoquinas en los MC, no se detectó la presencia de INF- γ , ni de IL-2. La concentración de IL-4 osciló entre 2,4 y 10pg/ml, y no encontramos en nuestro modelo *in vitro* una correlación entre la concentración de dicha citoquina y la proliferación de M-406. Semejante a lo observado *in vivo*, la correlación entre la concentración de IL-10 en los MC de MO y el porcentaje de proliferación del M-406 fue negativa, lo que indica que en este modelo, IL-10 podría participar en la inhibición del crecimiento tumoral ($r = -0,8252$, $P = 0,0016$) (Fig. 12). Estos resultados se oponen a los obtenidos por otros autores quienes encontraron que IL-10 puede funcionar como un factor de crecimiento autocrino para melanomas humanos⁷, algunos tipos de linfoma⁸, etc.

Figura 12. Correlación entre los niveles de IL-10 y la proliferación in vitro de M-406

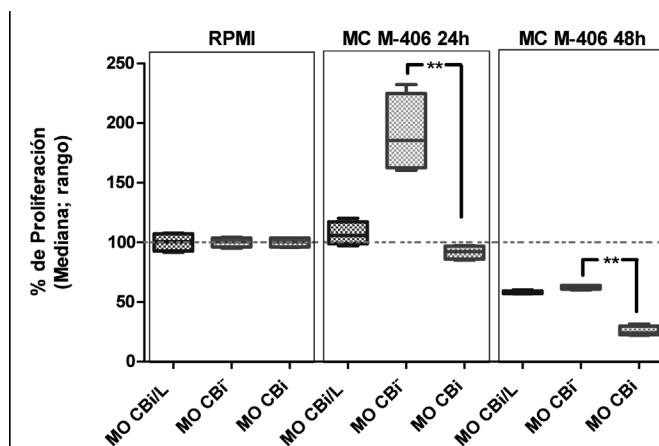
Proliferación de las células mononucleares incubadas en medios condicionados del tumor

Al comparar el porcentaje de proliferación de las MO de las diferentes líneas de ratón incubadas con los MC del tumor, se observó tanto en los MC de 24h como de 48h, una mayor proliferación de las MO de la línea CBi⁻ en comparación con la línea CBi (P=0,0073, P= 0,0072, respectivamente)(Fig 13).

Figura 13. Proliferación de células mononucleares de las diferentes líneas de ratón incubadas en los medios condicionados del tumor

Al analizar esos mismos resultados dentro de cada línea de ratón (Fig. 14), se observó una menor proliferación celular cuando los MO se cultivaron en los MC de 48h en todas las líneas estudiadas ($P=0,0001$); CBI/L FS 24h vs 48h ($P=0,0181$), CBI⁻ FS 24h vs 48h ($P=0,0073$) y CBI FS 24h vs 48h ($P=0,0119$).

Figura 14. Proliferación de células mononucleares de las diferentes líneas de ratón incubadas en los medios condicionados de tumor



CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que las diferentes líneas de ratón pertenecientes al Instituto de Genética Experimental de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNR y el adenocarcinoma de mama M-406, son un modelo ideal para el estudio de la Teoría de las tres “E” o de la Inmunoección Tumoral. Lo estudiado hasta el momento indica que la línea CBI/L FS, a pesar de presentar un alto coeficiente de consanguinidad, frente al desafío con el adenocarcinoma de mama M-406, desarrolla las tres fases de la inmunoección tumoral, eliminación, equilibrio y escape, a diferencia de lo observado en las líneas CBI FS y CBI⁻ FS que presentan un comportamiento homogéneo, escape o eliminación, respectivamente. Asimismo, la línea CBI/L FS en escape o eliminación, presentó un comportamiento intermedio

al manifestado por las líneas, CBI FS o CBI⁻ FS. Los estudios hechos hasta el momento no permitieron caracterizar los distintos estadios del crecimiento tumoral con respecto al tipo de respuesta inmune clásica, Th1 o Th2. No obstante se pudo observar, tanto *in vivo* como *in vitro* que altos niveles de IL-10 participarían en la inhibición del crecimiento del adenocarcinoma de mama M-406. Estudios posteriores permitirán reconocer los mecanismos involucrados en las distintas fases del crecimiento tumoral, lo que habilitaría en un futuro diseñar diferentes estrategias para el tratamiento y prevención del cáncer de mama.

SUMMARY

Animal models have been one of the keys to study the molecular mechanisms of cancer and for the development of new therapies in cancer. The results obtained in this study suggest that different mouse lines (CBI FS, CBI/L FS, and CBI⁻ FS) belonging to Institute of Experimental Genetics, School of Medical Sciences, National University of Rosario and the mammary adenocarcinoma M-406, are an ideal model for studying the theory of the three "E" or Tumor immunoediting, equilibrium (EQ), escape (ES) and elimination (EL). When CBI/L FS was challenged with M-406, despite having a high coefficient of inbreeding, in 51.6% of the animals the tumor grew exponentially (ES), in 30.0% the tumor was eliminated (EL) and in 18.7% the tumors grew to an average volume of 376 ± 14.70 mm³ (mean $\pm$ SE) and maintained that volume with no modifications (EQ) for a minimum of 10 days, thus showing the three stages of tumor immunoediting. In contrast, in lines CBI FS and CBI⁻ FS, the tumor showed a homogeneous behaviour, namely escape and elimination, respectively. The type of immune response depends, among other factors, on the set of cytokines; the Th1 response is associated with tumor removal, whereas the Th2 response is associated with progression. During the three phases of tumor growth in CBI/L FS we studied the serum concentration of Th1 cytokines: IL-2 and INF- γ , and Th2 cytokines: IL-4 and IL-10. It was not possible to characterize the different stages of tumor growth with respect to classical type of immune response, Th1 or Th2. However it was observed both *in vivo* and *in vitro* that IL-10 participated in the growth inhibition of M-406. Further studies will allow the recognition of the mechanisms involved in the different stages of tumor growth, which would enable a future design of different strategies for treatment and prevention of breast cancer.

REFERENCIAS

1. Chojniak, R., & Younes, R. N. 2003. *Am J Clin Oncol*, 26(4): 374-377.
2. Berner, V., et al, 2007. *Nat Med*, 13(3): 354-360.
3. Cho, H. I., et al, 2011. *Blood*, 117(1): 135-144.
4. Liu, Z., et al, 2005.. *J Immunol*, 174(4): 2242-2249.
5. Chen, W. F., & Zlotnik, A. 1991.. *J Immunol*, 147(2): 528-534.
6. Kundu, N., & Fulton, A. M. 1997. *Cell Immunol*, 180(1): 55-61.
7. Yue, F. Y., et al. 1997.. *Int J Cancer*, 71(4): 630-637.
8. Rico, M. J., et al. 2005.. *Clinical & Experimental Metastasis*, 22: 127-135.



ROL DE LOS ESTEROIDES GONADALES EN EL DESARROLLO DE TERATOMAS OVÁRICOS EN RATONES TRANSGÉNICOS HIPERSECRETORES DE HCG

Betina Gonzalez, Laura D. Ratner, Susana B. Rulli
Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET

INTRODUCCIÓN

El origen de los teratomas ha sido un tema rodeado de fascinación durante siglos. Con frecuencia se los atribuía a brujas, pesadillas o adulterio con el demonio. En la actualidad, se sabe que los teratomas surgen de la división partenogénica de un ovocito luego de la primera división meiótica (Linder y col., 1975), dando lugar a la diferenciación de una variedad de tejidos derivados de las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo), ubicados desordenadamente dentro del ovario (Ulbright, 2005). Estos tumores constituyen alrededor del 20% de las neoplasias ováricas en humanos. La causa de la aparición de estos tumores ha sido históricamente vinculada a aberraciones durante la división meiótica. Sin embargo, los mecanismos que desencadenan este evento son desconocidos, y hasta la fecha no han sido atribuidos a alteraciones endocrinas.

Estudios epidemiológicos y experimentales proveen fuerte evidencia del potencial tumorigénico de las gonadotrofinas en el ovario (Rulli y col., 2005). Recientemente hemos generado un modelo de ratones transgénicos que hipersecreta la hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG) en forma crónica (Rulli y col. 2002, 2003, 2005). Dichos ratones son infértiles, sufren significativas alteraciones en el perfil de hormonas esteroideas circulantes y desarrollan tumores de ovario de tipo teratoma. Estos tumores presentan características fenotípicas comparables a los teratomas humanos. Este modelo transgénico evidencia por primera vez una relación entre teratogénesis ovárica y desregulación hormonal. A partir de dichas evidencias se propone una posible influencia hormonal en el desarrollo de teratomas. En este sentido, un modelo animal con tales características resulta una herramienta útil para estudiar la posible influencia hormonal en la teratogénesis ovárica.

El objetivo del presente trabajo consistió en estudiar la influencia de las hormonas esteroideas gonadales sobre el desarrollo tumorigénico utilizando tratamientos experimentales *in vivo* en un modelo de ratones transgénicos que hipersecreta hCG.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cría y mantenimiento de los animales. Se utilizaron cepas de ratones transgénicos portadores de los genes de las subunidades hCG α y hCG β bajo el promotor universal de ubiquitina C, según descrito por Rulli y col. (2002, 2003). Los animales fueron mantenidos a una temperatura constante de 22 °C, con períodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y recibieron una dieta balanceada y agua *ad libitum*. En todo momento se respetaron las reglas de la “Guía para el cuidado y utilización de animales de laboratorio” del *Instituto Nacional de Salud* de los Estados Unidos (NIH), supervisados por el Comité de Ética del Instituto de Biología y Medicina Experimental. Para la obtención de animales doble transgénicos hCG $\alpha\beta$ + se cruzaron líneas independientes de machos hCG β + con hembras hCG α +. Como controles se utilizaron ratones de la cepa salvaje FVB/n (WT). La identificación del genotipo de los animales transgénicos se realizó a partir del análisis del ADN genómico obtenido de biopsias de cola de las crías, por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Rulli y col., 2002).

Tratamientos *in vivo*. Hembras WT y hCG $\alpha\beta$ + de 2 semanas de edad fueron sometidas a los siguientes tratamientos: a) antiandrogénico, por aplicación de un pellet de flutamida (20 mg), renovado cada 15 días, hasta el momento del sacrificio; b) antiestrogénico, por inyección en forma s.c. con una solución de fulvestrant en aceite de ricino (2 mg/kg) 3 veces por semana, hasta el momento del sacrificio; c) combinado, por aplicación de un pellet de flutamida (20 mg), reemplazado con un nuevo pellet cada 15 días, e inyección con una solución de fulvestrant en aceite de ricino (2 mg/kg) 3 veces por semana, hasta el momento del sacrificio; d) antiprogestagénica, por inyección s.c. con una solución de mifepristona en aceite de ricino (50 mg/kg) 3 veces por semana, hasta el momento del sacrificio. Los animales fueron sacrificados a las 6 ó 12 semanas de edad. La eficacia de los distintos tratamientos fue validada previamente.

Preparación de los tejidos. Los tejidos fueron fijados en paraformaldehído 4% durante una noche y embebidos en parafina. Se realizaron sec-

ciones de 5 μm para ser utilizados en tinción con hematoxilina-eosina (Rulli y col., 2002).

Análisis estadístico. Los resultados se expresaron como la media $\pm$ ESM. Se aplicó análisis de varianza (ANOVA) seguido del test post-hoc Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Se estudió el peso de los ovarios de hembras WT y hCG $\alpha\beta$ + de 6 semanas de edad, tratadas durante 4 semanas con los distintos tratamientos antihormonales (Fig. 1A). Tanto los tratamientos individuales con flutamida y fulvestrant como el tratamiento combinado indujeron una disminución significativa en el peso de los ovarios hCG $\alpha\beta$ +, siendo los distintos tratamientos igualmente eficaces ($p < 0,05$). El tratamiento con mifepristona fue el menos efectivo, ya que si bien se observó una tendencia a la disminución del peso ovárico ésta no fue estadísticamente significativa.

A las 6 semanas de edad, en el tratamiento con flutamida se observó una masiva luteinización, focos incipientes de células gigantes del trofoblasto, y una importante reducción en la ocurrencia de lagunas hemorrágicas en los ovarios hCG $\alpha\beta$ + tratados (Fig. 1C) comparados con los controles (Fig. 1B). En el tratamiento con fulvestrant se observó un cambio en la estructura general del ovario hCG $\alpha\beta$ +, detectándose en algunos casos una alta luteinización, con cuerpos lúteos definidos y ovocitos atrapados, y en otros casos una importante proporción de estructuras foliculares, en un gran número con expansión de las células del cúmulos (Fig. 1D). Asimismo, se observaron focos de diferenciación de células gigantes del trofoblasto muy incipientes en el ovario hCG $\alpha\beta$ + tratado con fulvestrant, en comparación con los grandes focos presentes en el ovario hCG $\alpha\beta$ + control. En el tratamiento combinado con flutamida-fulvestrant se observó el ovario altamente luteinizado, con cuerpos lúteos definidos, en algunos casos con restos de quistes hemorrágicos (Fig. 1E). Sin embargo, no se detectó la presencia de focos de células gigantes del trofoblasto. En el tratamiento con mifepristona se observó una histología muy similar a la del ovario hCG $\alpha\beta$ + control, observándose luteinización y zonas de invasión trofoblástica con lagunas sanguíneas (Fig. 1F).

A las 12 semanas de edad, tanto los tratamientos individuales con flutamida, fulvestrant o mifepristona como el tratamiento combinado indujeron una disminución significativa en el peso del ovario hCG $\alpha\beta$ +, siendo los distin-

tos tratamientos igualmente eficaces ($p < 0,05$) (Fig. 2A). En los ovarios de las hembras hCG $\alpha\beta$ + de 12 semanas de edad tratadas con flutamida, se observó una notable reducción en la presencia de focos de tejidos diferenciados, cuya proliferación resultó delimitada dentro de la estructura del ovario luteinizado (Fig. 2C). En algunos casos se observaron focos de células gigantes del trofoblasto, normalmente presentes en estadios previos del tumor, y ausentes a esta edad. En los ovarios de las hembras hCG $\alpha\beta$ + de 12 semanas de edad tratadas con fulvestrant, se detectó la presencia de una mayor variedad de tejidos diferenciados en comparación con aquellos animales bajo tratamiento con flutamida (Fig. 2D). Se observaron también focos de células gigantes del trofoblasto alrededor de tejidos diferenciados. El tejido ovárico resultó altamente luteinizado, con cuerpos lúteos definidos, y en algunos casos con ovocitos atrapados dentro del cuerpo lúteo. En los ovarios de las hembras hCG $\alpha\beta$ + de 12 semanas de edad tratadas con el tratamiento combinado se observó la presencia de grandes zonas hemorrágicas con células gigantes del trofoblasto (Fig. 2E). En algunos casos se detectaron pequeños focos de proliferación tisular en la periferia del ovario. El análisis histológico de los ovarios de las hembras hCG $\alpha\beta$ + de 12 semanas de edad tratadas con mifepristona mostró variabilidad en la respuesta al tratamiento. En algunos casos se detectó una gran diferenciación tisular, con pocos restos de tejido ovárico y ausencia de focos de células gigantes del trofoblasto. En otros casos se observó un retraso en la progresión tumoral, observándose focos de células gigantes del trofoblasto y diferenciación tisular muy incipiente (Fig. 2F).

DISCUSIÓN

Tanto los tratamientos individuales con el antiandrógeno flutamida y el antiestrógeno fulvestrant, como el tratamiento combinado de ambos, provocaron una disminución significativa en el peso del ovario hCG $\alpha\beta$ + a las 6 semanas de edad. A las 12 semanas se observó esta tendencia con todos los tratamientos, incluido el tratamiento antiprogestagénico con mifepristona. Si bien no se logró prevenir la aparición del tumor, ya que en todos los casos se detectó la presencia de tejidos diferenciados a las 12 semanas de edad, se observaron diferencias morfológicas significativas en los ovarios hCG $\alpha\beta$ + tratados, en comparación con los controles, en las dos edades analizadas.

A las 6 semanas de edad, la aparición de células gigantes del trofoblasto y la formación de lagunas hemorrágicas resultaron reducidas en los ovarios

sometidos a los tratamientos individuales con flutamida o fulvestrant, mientras que en el tratamiento combinado, no se llegaron a detectar dichos focos de diferenciación, lo que sugiere que la combinación de ambos tratamientos sería más efectiva en inhibir el desarrollo del tumor. La presencia limitada de estas células y del edema que las acompaña, podría explicar la reducción en el peso ovárico observado a esta edad. En contraste, el tratamiento con mifepristona no tuvo un efecto evidente sobre la morfología del ovario transgénico a las 6 semanas. De los resultados obtenidos se infiere que el bloqueo de la señalización de los receptores de andrógenos y/o estrógenos estaría afectando la progresión tumoral en etapas iniciales de la diferenciación de los tejidos, cuando las células gigantes del trofoblasto y estructuras que se asemejan a embriones post-implantatorios se hacen presentes en el ovario transgénico control.

Estudios previos mostraron que los andrógenos ejercen un rol en la diferenciación de tejidos durante el desarrollo embrionario temprano, previo a la diferenciación sexual (Goldman-Johnson y col., 2008). También se describió que el tratamiento de embriones pre-implantatorios con hidroxiflutamida, un metabolito de la flutamida que posee actividad antiandrogénica, provoca una inhibición dosis-dependiente en el desarrollo embrionario *in vitro*, la cual es revertida por el agregado de testosterona (Yallampalli y col., 1993). Estos estudios sugieren que el bloqueo del receptor de andrógenos afectaría el desarrollo de tejidos embrionarios, y podrían explicar los cambios en la morfología del tumor observada con los tratamientos antiandrogénico y combinado a las 12 semanas de edad. En esta etapa, el tratamiento con flutamida, sola o en combinación con fulvestrant, provocó una disminución evidente en la proliferación y diferenciación tisular, observándose además la presencia de estructuras hialinizadas en zonas de activación tumoral, indicativas de procesos degenerativos. Estos resultados sugieren que el tratamiento sostenido con flutamida no sólo sería capaz de afectar la diferenciación tisular, sino también podría alterar la funcionalidad de las células gigantes del trofoblasto. Dicho efecto podría deberse a una inhibición en la producción de factores angiogénicos y la formación de lagunas sanguíneas, que proveerían al tumor de los nutrientes y factores necesarios para su rápido crecimiento. La expresión de VEGF es normalmente inducida por hormonas sexuales, y muestra una clara correlación con la densidad de vasos sanguíneos, mediando la neoangiogénesis necesaria para el crecimiento de tumores (Hoeben y col., 2004). Tanto las células endoteliales como las células musculares lisas vasculares expresan receptores de estrógenos, de andrógenos y de pro-

gesterona (ER, AR, PR), y numerosas evidencias indican que los esteroides sexuales ejercen efectos sobre los vasos sanguíneos (Orshal y Khalil, 2004).

Resulta interesante que todos los tratamientos antihormonales hayan provocado una reducción significativa en el peso ovárico, previniendo el crecimiento explosivo del tumor observado en el ovario transgénico control. Esto podría deberse a cambios en el microambiente hormonal del ovario atípico, desencadenados por los distintos tratamientos. Un microambiente hormonal alterado podría afectar tanto a los vasos sanguíneos que alimentan el tumor, como directamente a los tejidos en desarrollo, ya que las hormonas esteroideas regulan una variedad de procesos fisiológicos que incluyen la diferenciación y homeostasis tisular. Estudios desarrollados por Sung y col. (2002), demostraron la producción de hormonas como estradiol, testosterona y progesterona por células embrionarias pluripotentes y cuerpos embrionarios, producidos *in vitro* a partir de la diferenciación de dichas células. Posteriormente, se observó que tanto las células embrionarias pluripotentes, como los cuerpos embrionarios expresan ER α , ER β y PR, y el tratamiento con hormonas esteroideas modula la proliferación y diferenciación de estas células hacia los distintos tejidos (Hong y col., 2004; Han y col., 2006). Estos estudios son particularmente relevantes para la interpretación del modelo hCG $\alpha\beta$ +, ya que las células embrionarias pluripotentes originan teratomas cuando son inoculadas en animales inmunosuprimidos (Li y col., 2009). Además, tanto la formación de teratomas *in vivo* como de cuerpos embrionarios *in vitro*, representan modelos de diferenciación tisular caótica, distinto de lo que ocurre en el desarrollo embrionario normal.

En conclusión, si bien los tratamientos antihormonales no lograron impedir la activación teratogénica, los mismos tuvieron un claro efecto sobre la progresión tumoral, frenando el crecimiento explosivo del teratoma. Estos resultados muestran una clara relación entre un perfil esteroideogénico alterado y la progresión de la teratogénesis ovárica.

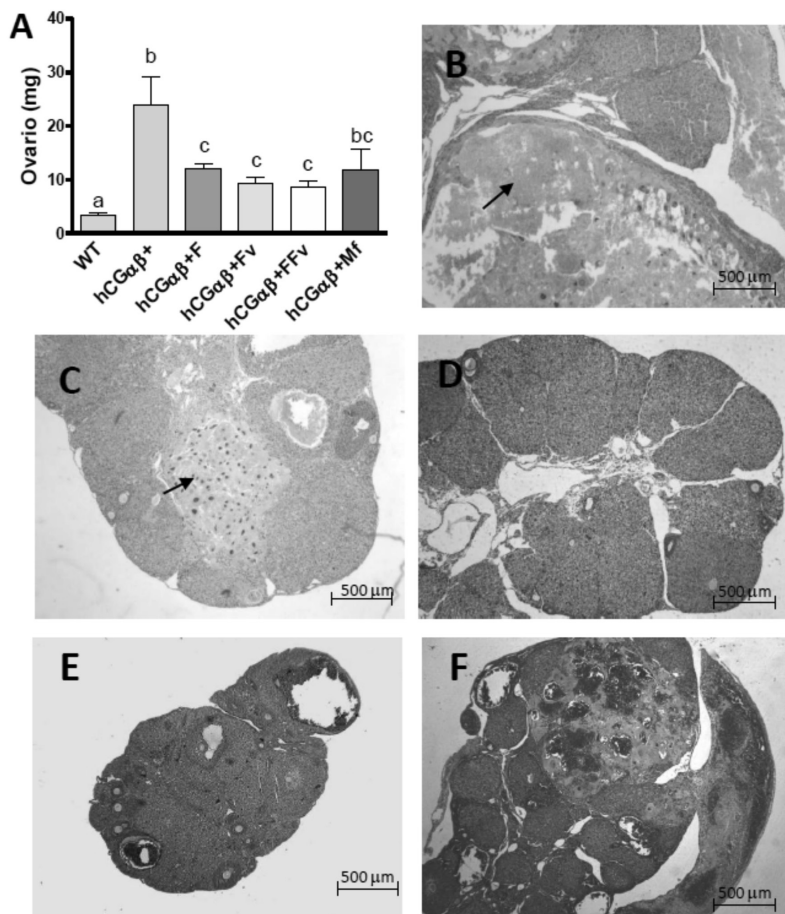


Figura 1. A) Peso ovárico de hembras WT y hCGαβ+ de 6 semanas de edad tratadas con flutamida (F), fulvestrant (Fv), flutamida-fulvestrant (FFv) y mifepristona (Mf) durante 4 semanas. ANOVA – Bonferroni. N=4-5. Letras distintas: $p < 0,05$. B-F) Morfología ovárica de hembras hCGαβ+ de 6 semanas de edad controles (B), tratadas con flutamida (C), fulvestrant (D), flutamida-fulvestrant (E) o mifepristona (F) durante 4 semanas. Tinción con hematoxilina y eosina. Flechas: sitios de diferenciación de células gigantes del trofoblasto.

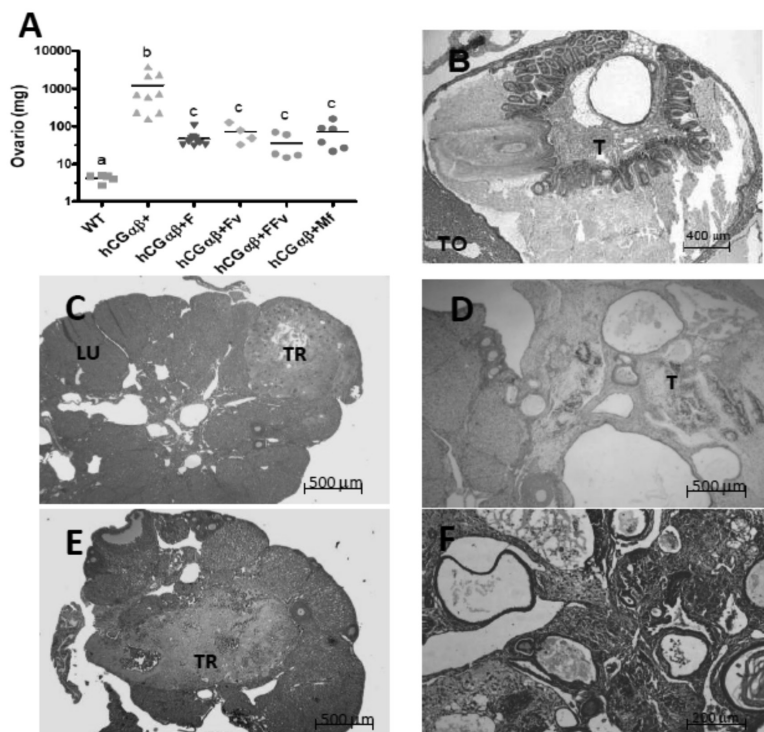


Figura 2. A) Peso ovárico de hembras WT y hCGαβ+ de 12 semanas de edad tratadas con flutamida (F), fulvestrant (Fv), flutamida-fulvestrant (FFv) y mifepristona (Mf) durante 10 semanas. ANOVA – Bonferroni. N=4-5. Letras distintas: $p < 0,05$. B-F) Morfología ovárica de hembras hCGαβ+ de 12 semanas de edad controles (B), tratadas con flutamida (C), fulvestrant (D), flutamida-fulvestrant (E) o mifepristona (F) durante 10 semanas. Tinción con hematoxilina y eosina. T: teratoma; TO: tejido ovárico; TR: trofoblastos.

RESUMEN

Estudios epidemiológicos y experimentales proveen fuerte evidencia del potencial tumorigénico de las gonadotrofinas en el ovario. Recientemente hemos generado un modelo de ratones transgénicos que hipersecreta la hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG) en forma crónica (ratones hCG $\alpha\beta$ +). Dichos ratones son infértiles, sufren significativas alteraciones en el perfil de hormonas esteroideas circulantes y desarrollan tumores de ovario de tipo teratoma. Estos tumores surgen de ovocitos activados partenogénicamente y dan origen a tejidos derivados del endodermo, mesodermo y ectodermo. El objetivo del presente trabajo consistió en estudiar la influencia de las hormonas esteroideas gonadales sobre el desarrollo tumorigénico utilizando tratamientos experimentales *in vivo* en el modelo de ratones transgénicos hCG $\alpha\beta$ +. Se estudió la influencia de: a) los estrógenos, por administración del antiestrógeno fulvestrant, b) los andrógenos, por administración del antiandrógeno flutamida, c) la progesterona, por administración del antiprogéstágeno mifepristona. Los animales fueron tratados desde las 2 semanas y sacrificados a las 6 ó 12 semanas de edad. Tanto los tratamientos individuales con flutamida y fulvestrant, como el tratamiento combinado de ambos, provocaron una disminución significativa en el peso del ovario hCG $\alpha\beta$ + a las 6 semanas. A las 12 semanas se observó esta tendencia con todos los tratamientos, incluido el tratamiento con mifepristona. Si bien no se logró prevenir la aparición del tumor, ya que en todos los casos se detectó la presencia de tejidos diferenciados a las 12 semanas de edad, se observaron diferencias morfológicas significativas en los ovarios hCG $\alpha\beta$ + tratados en las dos edades analizadas. Los tratamientos antihormonales tuvieron un claro efecto sobre la progresión tumoral, frenando el crecimiento explosivo del teratoma. Estos resultados muestran una clara relación entre un perfil esteroidogénico alterado y la progresión del desarrollo tumoral ovárico.

ABSTRACT

Epidemiological and experimental studies provide strong evidence about the tumorigenic potential of the gonadotropins on the ovary. Recently, we have generated a transgenic mouse model that chronically hypersecretes the human chorionic gonadotropin (hCG $\alpha\beta$ + mice). These mice are infertile, exhibit profound alterations of the steroid hormone profile and develop ovarian tumors with characteristics of teratomas. These tumors arise from parthenogenetically activated oocytes inside the ovary and consist of tissues derived from endodermic, mesodermic and ectodermic origin. The aim of this

work was to study the influence of the gonadal steroid hormones on tumor development in hCG $\alpha\beta$ + mice, by means of *in vivo* treatments. We studied the influence of: a) estrogens, through the administration of the antiestrogen fulvestrant; b) androgen, through the administration of the antiandrogen flutamide; c) progesterone, through the administration of the antiprogestagen mifepristone. The animals were treated from 2 to 6 or 12 weeks of age. The treatments with flutamide or fulvestrant, or both together, provoked a significant reduction of the ovarian weight at 6 weeks. At 12 weeks of age, the same tendency was observed with all the treatments, included mifepristone. Even though the tumor activation was not prevented, morphological differences were observed in the hCG $\alpha\beta$ + ovaries at both ages. The antihormonal treatments had a profound effect on the tumor progression, by reducing the explosive growth of the teratomas. These results show a clear relationship between an altered steroidogenic environment and the progression of tumor development of the ovary.

BIBLIOGRAFÍA

1. Goldman-Johnson DR, de Kretser DM, Morrison JR, 2008. Evidence that androgens regulate early developmental events, prior to sexual differentiation. *Endocrinology* 149: 5-14.
2. Han HJ, Heo JS, Lee YJ, 2006. Estradiol-17 β stimulates proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of MAPKs and CDKs as well as protooncogenes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 290: C1067-1075.
3. Hoebe A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA, 2004. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev*. 56: 549-580.
4. Hong SH, Nah HY, Lee YJ, Lee JW, Park JH, Kim SJ, Lee JB, Yoon HS, Kim CH, 2004. Expression of estrogen receptor- α and - β , glucocorticoid receptor, and progesterone receptor genes in human embryonic stem cells and embryoid bodies. *Mol Cells* 18: 320-325.
5. Li Z, Huang H, Boland P, Dominguez MG, Burfeind P, Lai KM, Lin HC, Gale NW, Daly C, Auerbach W, Valenzuela D, Yancopoulos GD, Thurston G, 2009. Embryonic stem cell tumor model reveals role of vascular endothelial receptor tyrosine phosphatase in regulating Tie2 pathway in tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 22399-22404.
6. Linder D, McCaw BK, Hecht F, 1975. Parthenogenic origin of benign ova-

- rian teratomas. *N Engl J Med* 292:63-66.
7. Orshal JM, Khalil RA, 2004. Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 286: R233-249.
 8. Rulli SB, Ahtiainen P, Mäkelä S, Toppari J, Poutanen M, Huhtaniemi I, 2003. Elevated steroidogenesis, defective reproductive organs, and infertility in transgenic male mice overexpressing human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 144: 4980-4990.
 9. Rulli SB, Huhtaniemi I, 2005. What have gonadotrophin overexpressing transgenic mice taught us about gonadal function?. *Reproduction.* 130: 283-291.
 10. Rulli SB, Kuorelahti A, Karaer O, Pelliniemi LJ, Poutanen M, Huhtaniemi I, 2002. Reproductive disturbances, pituitary lactotrope adenomas, and mammary gland tumors in transgenic female mice producing high levels of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 143: 4084-4095.
 11. Sung JH, Yoon HS, Lee JS, Kim CG, Kim MK, Yoon YD, 2002. Differentiation and apoptosis of the mammalian embryo and embryonic stem cells (ESC). I. Establishment of mouse ESC and induction of differentiation by reproductive hormones. *Dev Reprod.* 6: 55-66.
 12. Ulbright TM, 2005. Germ cell tumors of the gonads: a selective review emphasizing problems in differential diagnosis, newly appreciated, and controversial issues. *Mod Pathol* 18 Suppl 2:S61-79.
 13. Yallampalli C, Osuamkpe C, Nagamani M, 1993. Influence of the anti-androgen hydroxyflutamide on in vitro development of mouse embryos. *J Reprod Fertil.* 99: 467-470.



REGULACIÓN NEUROENDOCRINA DE LA RESPUESTA INMUNE: ACETILCOLINA COMO MODULADOR AUTÓCRINO Y PARÁCRINO DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Gabriela Salamone
Academia Nacional De Medicina

ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO SOBRE EL TEMA Y OBJETIVO GENERAL

Las células dendríticas (CDs) son células presentadoras de antígeno profesionales que expresan una cualidad única: activar linfocitos T vírgenes, poniendo en marcha la respuesta inmune adaptativa. La relevancia de las CDs en la respuesta inmune no guarda sólo relación con su capacidad de activar a los linfocitos T naïve; son ellas las que deciden el perfil particular en el que se diferenciarán las células T CD4+ al activarse: Th1, Th2, Th17 o T regulatorio. Esta decisión depende, en última instancia, de la producción de citoquinas por las propias CDs. La producción de IL-12p70 favorecerá la diferenciación de las células T CD4+ en un perfil Th1. Su ausencia, junto a la presencia de IL-4 (producida por células NKT y mastocitos), promoverá la diferenciación de las células T CD4+ en un perfil Th2. Por último, la producción de IL-6, IL-23 y TGF- β promoverá la diferenciación de las células T CD4+ en un perfil Th17, mientras que la producción de IL-10 junto a TGF- α , en ausencia de IL-6, promoverá su diferenciación en un perfil T regulatorio (1,2).

¿Qué determina el patrón de producción de citoquinas de las CDs? El particular “set” de receptores activado en la CD enfrentada al proceso infeccioso. En primer lugar, el tipo de receptores de reconocimiento de patrones (RRP) activados. En segundo, los receptores de citoquinas activados (1,2). Sin embargo, el universo de estímulos que deberá enfrentar la CD en el foco inflamatorio no se restringe a productos microbianos y citoquinas. El presente proyecto concierne a un aspecto poco analizado: el impacto de mediadores neuroendócrinos en la fisiología de las CDs.

La Acetilcolina (ACh) es el neurotransmisor de los nervios parasimpáticos ganglionares y post-ganglionares y un mediador parácrino no-neuronal producido por diferentes tipos celulares (3,4). La ACh es sintetizada a partir

de acetil coenzima A y la colina en una reacción catalizada por la colina colina acetiltransferasa (ChAT). La acción biológica de la ACh es mediada por dos diferentes grupos de receptores: los receptores nicotínicos (nAChR) y los receptores muscarínicos (mAChR). Estos receptores poseen una amplia distribución tisular y pueden modular diferentes funciones dependiendo del subtipo particular de receptor activado (3,4).

En lo relativo a la acción inmunomodulatoria mediada por la ACh, la atención se ha concentrado mayormente en los procesos inflamatorios que ocurren en el tracto respiratorio, estableciéndose que tanto una producción incrementada de ACh en el tracto respiratorio, como una disfunción de los receptores que median su acción, participarían en la etiopatogénesis de enfermedades inflamatorias crónicas de las vías respiratorias, tales como asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (3,5,6). Sin embargo, los blancos celulares responsables de las acciones inmunomodulatorias ejercidas por la ACh no han sido aún definidos con claridad.

En los últimos años se ha establecido que la ACh excede su papel como neurotransmisor del sistema parasimpático. Parecería estar involucrado en la regulación local de numerosas funciones celulares, en una amplia variedad de sistemas no-neuronales, entre ellos, el sistema inmune. La amplia distribución tisular de ChAT en células no-neuronales suele estar acompañada por la presencia de colinesterasas y un patrón diferencial de receptores nicotínicos y/o muscarínicos. La presencia de un sistema colinérgico completo en una gran variedad de tipos celulares plantea la posibilidad de que el mismo constituya un sistema primordial en la fisiología celular y por consiguiente en el mantenimiento de la homeostasis de diferentes tejidos (4).

Es sabido que el desarrollo de fenómenos alérgicos que involucran al árbol respiratorio se asocia a una serie de mecanismos relacionados: el desarrollo de un perfil Th2, la hiperreactividad bronquial, la excesiva producción de secreciones mucosas y el remodelamiento estructural de la vía aérea (9). La ACh incrementa la producción de secreciones mucosas y se ha postulado que, además, podría jugar un rol relevante en la regulación de los mecanismos que conducen a la remodelación estructural de las vías aéreas durante el desarrollo de los procesos inflamatorios crónicos (6,10).

Ha sido demostrado que los linfocitos T activados provenientes de individuos asmáticos secretan más ACh en comparación con los provenientes de individuos sanos (11). Se ha postulado que la presentación crónica de los alérgenos aumenta la expresión de mAChR en linfocitos T, incrementando su susceptibilidad a las acciones modulatorias mediadas por ACh (5). Por

último, se ha observado que la ACh promueve la supervivencia de los linfocitos T activados (12).

No existen trabajos previos en la literatura científica que hayan analizado la acción de la ACh sobre las CD. El presente proyecto abordó la siguiente pregunta: si la Acetilcolina en forma autócrina o parácrina podría modular la fisiología de las CD.

RESULTADOS OBTENIDOS

Nuestro grupo ha estado trabajando, en los últimos años, en la relevancia del Sistema Colinérgico autócrino y parácrino sobre la fisiología de las CD. A continuación, se describen en forma resumida los resultados más importantes, los cuales han sido publicados recientemente en el *J.Neuroimmunology* 236:47-56; 2011.

Nuestro trabajo demuestra la presencia de un Sistema Colinérgico completo en las CD y la capacidad del mismo de modular la fisiología de las mismas.

1- Las CD expresan los receptores muscarínicos (RM) M3, M4 y M5.

Se evaluó la expresión de receptores muscarínicos (RM) en CD (diferenciadas por tratamiento de monocitos con IL-4 + GM-CSF) a través de Western-blot y microscopía confocal (Figura 1). Observamos que las CD expresan los receptores M3, M4 y M5, pero no los receptores M1 y M2. Los mismos fueron evaluados también por citometría de flujo (datos no mostrados).

2- Las CD expresan ChAT (colina acetiltransferasa) y AChE (acetilcolinesterasa).

La expresión de la enzima AChT, enzima responsable de la síntesis de ACh, fue analizada por RT-PCR, Western-blot y microscopía confocal (Figura 2). Los resultados obtenidos muestran que las CD expresan ChAT, y esta expresión se encuentra disminuida cuando las CD son maduras por 24 hs con LPS. La expresión de AChE fue evaluada por Western-blot y por microscopía confocal, encontrándose una clara expresión tanto en CD inmaduras como en aquellas tratadas con LPS.

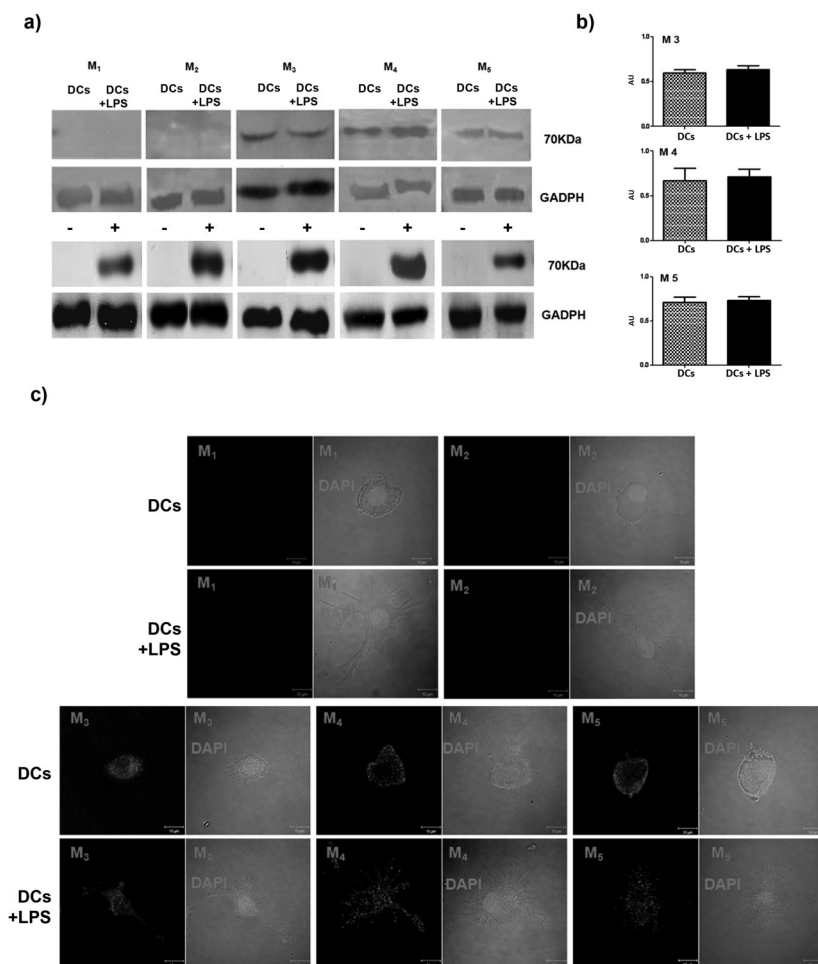


Figura 1. CDs humanas expresan M₃, M₄ y M₅. Las CDs inmaduras fueron obtenidas a partir de monocitos en presencia de IL-4 y GM-CSF durante 5 días. Para obtener CDs maduras, las CDs inmaduras fueron tratadas por 24hs con 100 ng/ml de LPS. La expresión de receptores muscarínicos fue evaluada por Western-blot (a) y (b) y microscopía confocal (c). Un experimento representativo se muestra en (a) y (c) (n=5). Los datos cuantificados por densitometría son mostrados en (b). Esos datos son expresados como la media $\pm$ SEM de 5 experimentos.

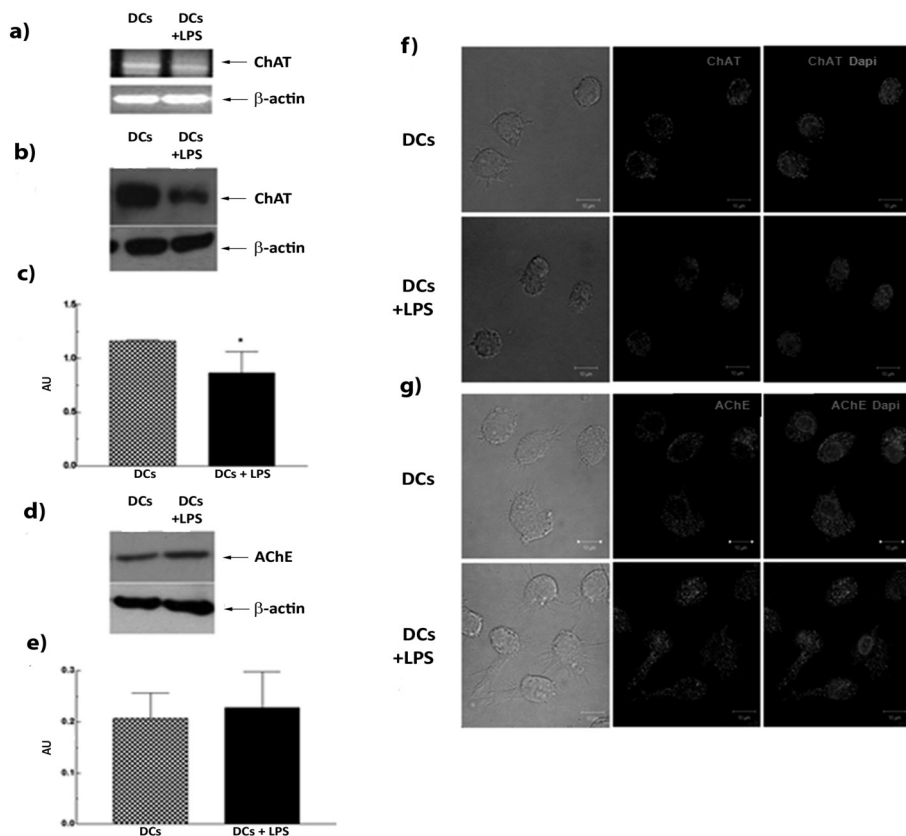


Figura 2. CD's humanas expresan la enzima colina acetiltransferasa (ChAT) y acetilcolinesterasa (AChE). La expresión de ChAT en CD's tratadas o no con LPS (100ng/ml) fue analizada por RT-PCR (a), Western-blot (b), y microscopía confocal (f), mientras que la expresión de AChE fue analizada por Western-blot (d), y microscopía confocal (g). Un experimento representativo se muestra en la figura a, b, d, f y g (n=4-5). La cuantificación por densitometría se muestra en (c) y (e). Estos datos son expresados como la media $\pm$ SEM de 4-5 experimentos. * $p < 0.05$ para CD's + LPS vs CD's.

El Sistema Colinérgico modula la fisiología de la CD

3-El carbacol modula el fenotipo y la función de la CD.

Las CDs fueron diferenciadas a partir de monocitos en presencia de IL-4 y GM-CSF durante 5 días. Luego fueron cultivadas en presencia o ausencia de LPS (100ng/ml) y en presencia o ausencia de carbacol (10^{-9} a 10^{-7}) durante 24 hs. Se analizó posteriormente la expresión de HLA-DR por citometría de flujo en CDs. Los resultados mostrados en las Figuras 3a y b indican que la presencia de carbacol induce un incremento en la expresión de HLA-DR en CDs inmaduras y una disminución significativa en la expresión de HLA-DR, en las CDs tratadas con LPS 100ng /ml.

Nos preguntamos entonces, si la modulación en la expresión de HLA-DR se podía correlacionar con la capacidad de las CDs de inducir proliferación de células T. Para ello, realizamos ensayos de CML en los cuales las CDs, cultivadas en presencia o ausencia de carbacol y/o en presencia o ausencia de LPS, fueron utilizadas como células estimuladoras al co-cultivarse con células mononucleares de sangre periférica alogeneica, durante 5 días. La capacidad estimulatoria de las CDs fue evaluada por incorporación de timidina tritiada en aquellas células proliferantes.

Como se observa en la Figura 3 c, las CDs inmaduras tratadas con carbacol indujeron un aumento en la proliferación de células T, mientras que las CDs tratadas con carbacol y maduras con LPS indujeron una disminución en la proliferación T.

Por otra parte, las CDs fueron cultivadas en presencia o ausencia de carbacol, y en presencia o ausencia de LPS (100ng/ml) durante 24 hs. De esta manera, evaluamos si el carbacol era capaz de modular la producción de citoquinas, y observamos que el carbacol incrementa la producción de TNF- α en CDs inmaduras, y disminuye la producción de IL-12 y TNF α cuando las CDs son maduras con LPS (Figura 4 a y b). Debido a que el TNF- α es capaz de inducir la maduración fenotípica de CDs, nosotros analizamos si la estimulación de la producción de TNF- α por carbacol podría condicionar su habilidad de estimular la expresión de HLA-DR en CDs. Para ello incubamos a las CDs con etanercept, un antagonista del TNF- α , en simultáneo con los tratamientos mencionados previamente. Como podemos observar en la Figura 4c, el etanercept previene completamente el incremento de la expresión de HLA-DR inducida por carbacol, sugiriendo que el incremento en la expresión de HLA-DR es mediada por la producción de TNF- α en una forma autócrina y/o parácrina.

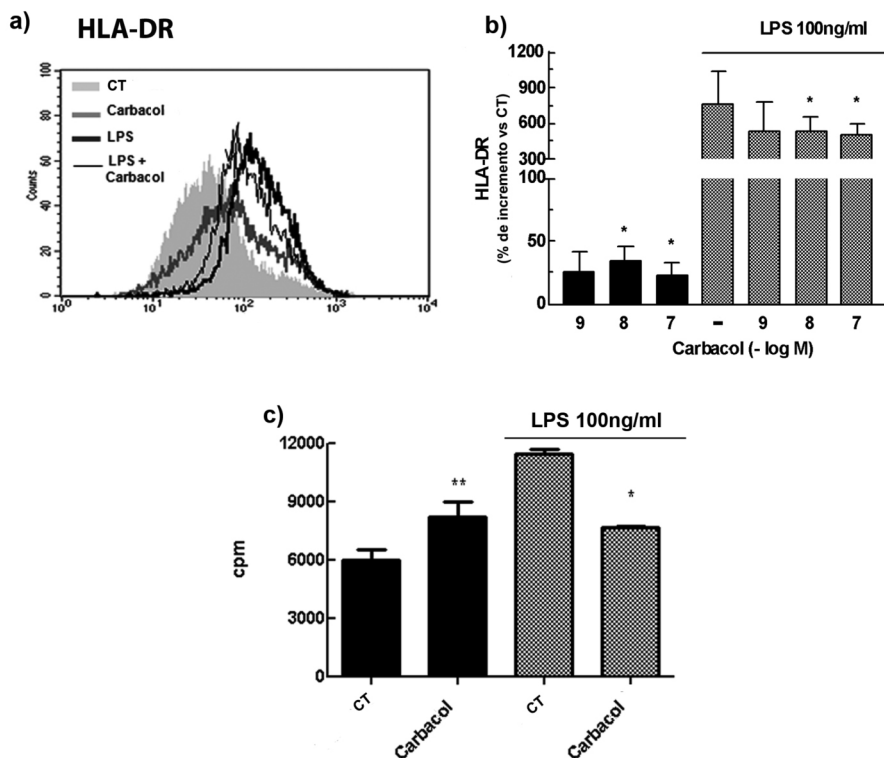


Figura 3. El carbacol modula el fenotipo y la función de la CD. Las CDs fueron cultivadas en presencia o ausencia de carbacol (10^{-9} - 10^{-7}) y en presencia o ausencia de LPS 100ng/ml, durante 24hs. La expresión de HLA-DR fue analizada por citometría de flujo a) y b), y la habilidad de las CDs para inducir la respuesta de un cultivo mixto linfocitario (CML) c). A) Muestra un experimento representativo de 5 realizados. B) Los resultados son expresados como el porcentaje de incremento de la intensidad media de fluorescencia de HLA-DR (* $p < 0.05$ carbacol vs controles y LPS + carbacol vs LPS). C) Los resultados son expresados como cpm y representan la media $\pm$ SEM de 5 experimentos evaluados por triplicado (** $p < 0.01$ carbacol vs CT y $p < 0.05$ carbacol + LPS vs LPS)

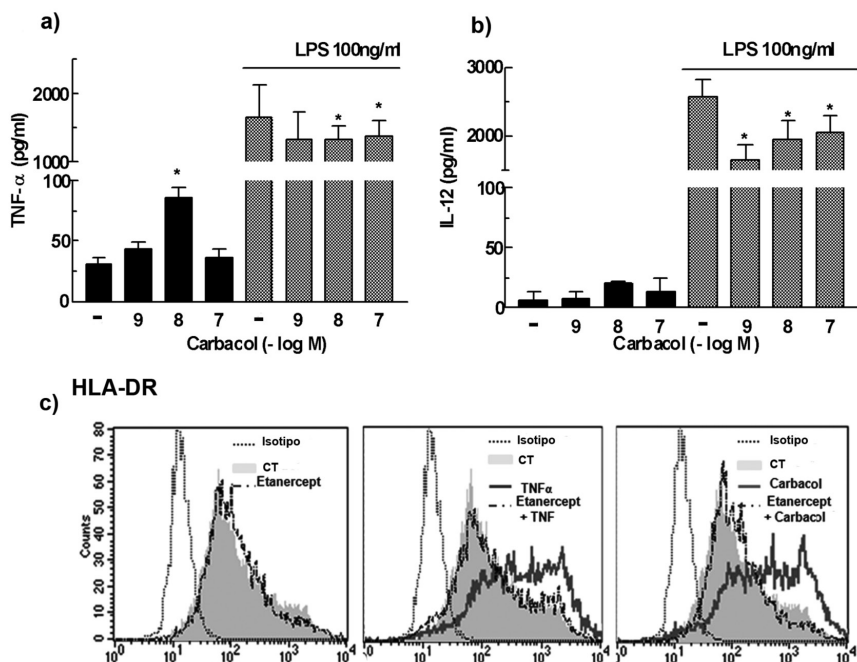


Figura 4. El Carbacol modula la producción de TNF- α e IL-12 en CDs: Las CDs fueron cultivadas en presencia o ausencia de carbacol (10⁻⁹-10⁻⁷) y en presencia o ausencia de LPS (100ng/ml) durante 24hs. a) y b) La producción de TNF- α e IL-12 fue evaluada por Elisa. Los resultados son expresados en pg/ml y representan la media $\pm$ SEM de 5-7 experimentos (* $p < 0.05$ carbacol vs controles y LPS + carbacol vs LPS). c) Las CDs fueron cultivadas en presencia o ausencia de etanercept (500ng/ml) y se evaluó la expresión de HLA-DR por citometría de flujo; la figura muestra un experimento representativo de 3 realizados. Se utilizó como control positivo el agregado de TNF- α 50ng/ml.

Resultados similares a los expuestos previamente, se han observado cuando los monocitos fueron cultivados en presencia de carbacol durante la diferenciación a CDs durante 5 días. Observamos también que el incremento en la expresión de HLA-DR y en la producción de TNF era mediado claramente por los receptores muscarínicos. Por último, observamos que la producción autócrina de ACh también inducía un incremento en la producción de TNF- α (datos no mostrados).

En conclusión podemos decir que nuestro grupo ha observado que las CD humanas poseen, al igual que los linfocitos T, un sistema colinérgico completo; expresan receptores muscarínicos y las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y colina acetiltransferasa (ChAT). Observamos, además, que la ACh modula la funcionalidad de las CD inhibiendo la producción de IL-12p70 y TNF- α , en CD maduras con LPS. Por el contrario, en CD inmaduras, la ACh mostró incrementar notoriamente la producción de TNF- α e incrementar la expresión de HLA-DR; este último punto fue corroborado por ensayos de cultivo mixto linfocitario (CML). Estas observaciones sugieren que la ACh podría modular la función de las CD de un modo diferencial, atendiendo a su particular estado de activación.

ABSTRACT:

Dendritic cells (DCs) are highly specialized antigen-presenting cells with a unique ability to activate resting T lymphocytes. Acetylcholine (ACh) is the primary parasympathetic neurotransmitter and also a non-neural paracrine factor produced by different cells. Here, we analyzed the expression of the cholinergic system in DCs. We found that DCs express the muscarinic receptors M3, M4 and M5, as well as the enzymes responsible for the synthesis and degradation of ACh, choline acetyltransferase (ChAT) and acetylcholinesterase (AChE), respectively. Differentiation of DCs in the presence of the cholinergic agonist carbachol, the synthetic analog of ACh, resulted in an increased expression of HLA-DR and CD86 and the stimulation of TNF- α and IL-8 production. All these effects were prevented by atropine, a muscarinic ACh receptor (mAChR) antagonist. Carbachol, was also able to modulate the function of DCs when added after the differentiation is accomplished; it increased the expression of HLA-DR, improved the T cell priming ability of DCs, and stimulated the production of TNF- α but not IL-12 or IL-10. By contrast, carbachol significantly inhibited the stimulation of HLA-DR expression and the enhancement in the T cell priming ability of DCs triggered by LPS. Interestingly, the TNF- α antagonist etanercept completely prevented the increased expression of HLA-DR induced by carbachol, suggesting that it promotes the phenotypic maturation of DCs by stimulating the production of TNF- α . ACh induced similar effects than carbachol; it stimulated the expression of HLA-DR and the production of TNF- α , while inhibited the stimulation of HLA-DR expression and IL-12 production triggered by LPS. These results support the existence of an autocrine/paracrine loop through which ACh modulate the function of DCs.

REFERENCIAS

1. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Yong-Jun L, Pulendran B, and Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* (2000) 18:767-811.
2. Steinman RM, Hawiger D, and Nussenzweig C. Tolerogenic dendritic cell. *Annu. Rev. Immunol.* (2003); 21:685-711.
3. Racké K, Juergens UR, and Matthiesen S. Control by cholinergic mechanisms. *Eur. J. Pharmacol.* (2006); 533: 57–68.
4. Wessler I and Kirkpatrick CJ. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br. J. Pharmacol.* (2008); 154: 1558–157.
5. Gwilt CR, Donnelly LE, and Rogers DF. The non-neuronal cholinergic system in the airways: An unappreciated regulatory role in pulmonary inflammation? *Pharmacol. & Ther.* (2007); 115: 208–222.
6. Gosens R, Zaagsma J, Meurs H and Halayko AJ. Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir. Res.* (2006); 7:73.
7. Lambrecht BN. Immunologists getting nervous: neuropeptides, dendritic cells and T cell activation. *Respir Res.* (2001); 2(3):133-8.
8. Steinman L. Elaborate interactions between the immune and nervous systems. *Nat. Immunol.* (2004); 5(6): 575-581.
9. Salamone Gabriela y Nahmod Karen , “Hipersensibilidad”. Introducción a la Inmunología humana. Ed. Panamericana 5º Editores: Faimboin L. y Geffner J. (2005) Cap. 19, págs.451-478.
10. [Gosens R](#), [Zaagsma J](#), [Grootte Bromhaar M](#), [Nelemans A](#), and [Meurs H](#). Acetylcholine: a novel regulator of airway smooth muscle remodelling? *Eur. J. Pharmacol.* (2004); 500(1-3):193-201.
11. Gosens R, Zaagsma J, Meurs H and Halayko AJ. Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir. Res.* (2006); 7:73.
12. Ricci A, Amenta F, Bronzetti E, Mannino F, Mariotta S, and Tayebati SK. Expression of peripheral blood lymphocyte muscarinic cholinergic receptor subtypes in airway hyperresponsiveness. *J. Neuroimmunol.* (2002); 129(1-2):178–185.

ESTUDIO *IN VIVO* DE LA RESPUESTA ANTITUMORAL DESENCADENADA POR LA INMUNOTERAPIA DIRIGIDA CONTRA LA PROTEÍNA TRANSDUCTORA DE SEÑALES Y ACTIVADORA DE LA TRANSCRIPCIÓN 3 (STAT3)

Mercedes Tkach, Martín Rivas, Roxana Schillaci
Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET

INTRODUCCIÓN

Múltiples evidencias indican que la proteína transductora de señales y activadora de transcripción 3 (Stat3), es un punto de convergencia de muchas vías oncogénicas (1). La activación persistente de Stat3 ha sido encontrada en una gran variedad de tumores y, en particular, en cáncer de mama está ligada a la tumorigénesis (2) y asociada a la resistencia a quimioterapia (3;4). Interesantemente, en experimentos de terapia génica en el melanoma B16, utilizando un vector de expresión dominante negativo de Stat3 (DN-Stat3), de forma inesperada se puso de manifiesto la participación de Stat3 en la supresión tumoral del sistema inmune (5). Luego, Wang y col. demostraron que la activación de Stat3 en células tumorales es un regulador negativo de la respuesta inflamatoria que conduce a la inhibición de la respuesta inmune innata y adaptativa (6).

Actualmente, existen gran cantidad de evidencias experimentales que indican que la progesterona está involucrada en el control de la tumorigénesis mamaria, tanto en mujeres como en modelos animales (7;8). En particular, hemos demostrado que los progestágenos inducen la activación de Stat3 y que es un requisito absoluto para la estimulación del crecimiento *in vivo* e *in vitro* progestágeno-dependiente.(9). Realizamos estos experimentos con el tumor C4HD, que es un adenocarcinoma de mama murino progestágeno-dependiente y requiere la administración de acetato de medroxiprogesterona (MPA) para proliferar (10). Teniendo en cuenta que Stat3 está constitutivamente activo en cáncer de mama avanzado (11;12) y que la disrupción de la señalización de Stat3 en células tumorales puede superar la evasión tumoral (6;13), diseñamos una estrategia de inmunoterapia basada en la inyección seriada de células C4HD transfectadas con un vector DN-Stat3. Este protocolo demostró inhibir el desarrollo *in vivo* del tumor C4HD salvaje en ratones

Balb/c a través de una respuesta inmune celular. El objetivo del presente trabajo, fue caracterizar *in vivo* las células del sistema inmune intervinientes en el rechazo tumoral, lo cual será de fundamental importancia para determinar la población de células citotóxicas. Asimismo, se exploró utilidad de la administración de esta inmunoterapia en forma terapéutica.

MATERIALES Y METODOS

Animales y tumor C4HD

Se utilizaron hembras Balb/c del bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental, de acuerdo a los estándares de uso humanitario de animales de laboratorio del NIH. Se utilizó el adenocarcinoma mamario murino progéstanogeno-dependiente C4HD (10).

Cultivos celulares

Los cultivos primarios de células epiteliales se realizaron según lo descrito previamente (8). Los mismos se dejaron adherir durante 48 hs en medio DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium: Ham's F12, 1:1) sin rojo fenol + suero fetal bovino (SFB) 10% v/v. Las células se transfectaron por 48hs con medio + SFB libre de esteroides (SFBch) 2.5% v/v + MPA 10 nM + 2mg del dominante negativo (DN) de Stat3 denominado Stat3Y705-F(9). Como controles se utilizaron células transfectadas con el vector vacío (pRc/CMV).

Protocolo de inmunización

Los ratones Balb/c se inmunizaron con 2×10^6 células C4HD, transfectadas con DN-Stat3 (C4HD DN-Stat3) en presencia de MPA e irradiadas (50Gy), cada 15 días en 3 oportunidades. El grupo control fueron ratones inyectados con 2×10^6 células C4HD transfectadas con el vector vacío (C4HD vector vacío) en presencia de MPA e irradiadas.

Depleción de células CD4+, CD8+ NK Luego de 15 días de la última inmunización, se desafiaron los ratones con tumor el C4HD en presencia de un *pellet* de 40mg de MPA. Ese día y dos días sucesivos, se administrarán a distintos grupos de los animales una dosis de 10 mg/ratón de anticuerpos anti CD4 (YTS191.1), anti CD8 (YTS169.4), anti NK (anti asialo GM) o IgG control, como así también a la semana de la última dosis de anticuerpos. Se monitoreó el crecimiento tumoral a lo largo de 30 días y se verificó la depleción de

las respectivas poblaciones linfocitarias obteniendo sangre de la vena facial y posterior identificación de linfocitos por inmunofluorescencia y análisis por citometría de flujo. Se monitoreó el crecimiento tumoral a lo largo del tiempo midiendo el largo (L) y el ancho (A) de los tumores con un calibre y calculando el volumen a través de la fórmula $L \times A^2/2$.

Protocolo terapéutico Se desafiaron ratones Balb/c con tumor C4HD en presencia de MPA y, luego de 5 días, cuando el tumor fue palpable, se comenzaron las inmunizaciones al día 5 y 17 con células C4HD DN-Stat3 o con C4HD vector vacío como control. Se monitoreó el crecimiento tumoral a lo largo del tiempo.

Análisis histopatológico

Al finalizar los experimentos los tumores fueron removidos fijados en formol neutro 10% e incluidos en parafina. Se realizó tinción con hematoxilina-eosina (H&E) para realizar el análisis histopatológico.

Determinación de IFN-g intracitoplasmático

A los 14 días de la última inoculación, del protocolo profiláctico, se obtuvieron esplenocitos de los ratones Balb/c inmunizados y se co-cultivaron durante 6h en presencia o ausencia de células C4HD con el agregado de 2mM de monensina en ambos casos. Luego, las células se sometieron a una inmunofluorescencia directa para determinar la expresión de CD3, CD4, CD8, DX5 y luego se permeabilizaron con saponina incubándose finalmente con anticuerpos anti IFN-g. La fluorescencia fue analizada en un citómetro de flujo FACS Aria.

RESULTADOS

Caracterización in vivo de las células del sistema inmune intervinientes en el rechazo tumoral.

Para ello, se inmunizaron ratones hembras Balb/c en 3 oportunidades, como se describe en materiales y métodos, con células C4HD DN-Stat3 o con células C4HD vector. Se desafiaron los animales con el tumor C4HD en presencia de MPA. Ese día y dos días sucesivos se administraron a distintos grupos de animales anticuerpos anti CD4, anti CD8, anti NK o IgG como control. Se observó que la depleción de células NK y CD4+ impidió el efecto antitumoral generado por la inmunización de células C4HD con Stat3 bloqueado

(Fig 1A). Llamativamente la población CD8+ (células citotóxicas clásicas), no son las células citotóxicas comprometidas en la citotoxicidad antitumoral generada por la inmunización de células tumorales con Stat3 bloqueado. La depleción de las subpoblaciones linfocitarias mencionadas fue completa cuando se determinó a la semana de la primera inyección de los anticuerpos, mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo en sangre periférica de todos los animales (Fig 1B).

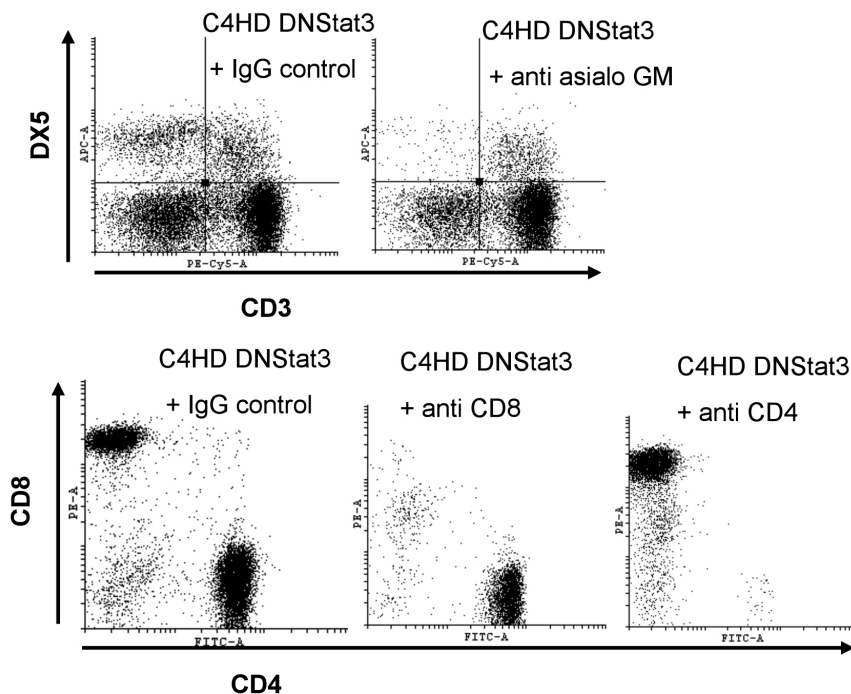


Figura 1. A Los ratones Balb/c, fueron inmunizados tres veces con intervalos de 15 días con 2×10^6 cel C4HD transfectadas con vector vacío o con DNStat3. Luego de 15 días de la última dosis, los animales fueron desafiados con un fragmento del tumor C4HD e implantados con un pellet de MPA y se administraron anticuerpos anti CD4, CD8, NK o IgG control (ver materiales y métodos) Se monitoreó el crecimiento tumoral hasta el día 29. B Para comprobar la eficacia de la depleción celular, se obtuvo una pequeña alícuota de sangre de los ratones y se determinó la presencia de células NK (CD3-/DX5+), células T CD4+ (CD3+/CD4+) y de células T CD8+ (CD4+/CD8+). Este experimento se realizó dos veces con resultados similares.

Los ratones Balb/c fueron inmunizados tres veces con células C4HD wild type, con células C4HD transfectadas con el constructo DN Stat3 o con vector vacío e irradiadas en todos los casos o inyectados con PBS, según lo descrito en materiales y métodos.

Sabiendo que el IFN- γ es una de las principales citoquinas con efecto anti-tumoral, se determinó si las células T CD4+ y NK, provenientes de ratones inmunizados con células C4HD DN-Stat3, eran capaces de sintetizarlo. Para ello, obtuvimos esplenocitos de animales inmunizados y los co-cultivamos con células C4HD, realizamos la determinación de IFN- γ intracitoplasmático por inmunofluorescencia y análisis por citometría de flujo. De esta forma, comprobamos que un mayor número de linfocitos T CD4+ provenientes de animales inmunizados con células C4HD DN-Stat3 expresan IFN- γ cuando se los enfrenta con las células tumorales C4HD salvajes con respecto a los provenientes de animales inmunizados con células C4HD con vector vacío (Fig 2). De forma similar, observamos que la población de células NK (CD3-/DX5+) proveniente de animales inmunizados con células C4HD DN-Stat3 produjeron mayor cantidad de IFN- γ . (Fig 2) Al realizar este estudio en linfocitos T CD8+, no observamos modificación en la producción de IFN- γ en ninguno de los grupos experimentales. Estos resultados avalan los resultados anteriormente informados en el cual se caracterizaban a los linfocitos T CD4+ y a los NK como efectoras del efecto antitumoral.

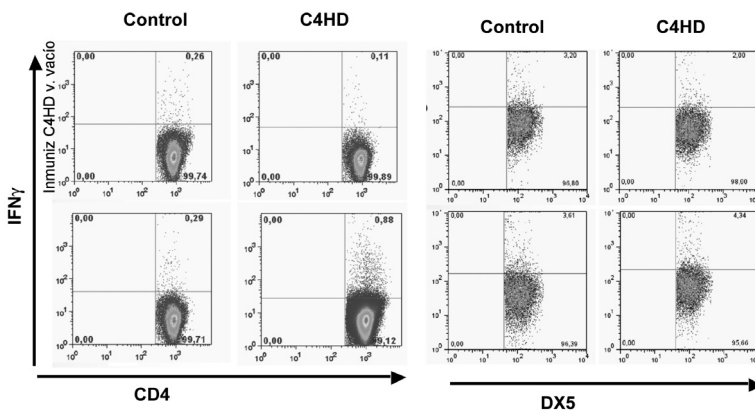


Figura 2. Los esplenocitos obtenidos a los 14 días de la última inoculación con células C4HD DN-Stat3 o con células C4HD vector vacío, y se co-cultivan durante 6h en presencia o ausencia de células C4HD con el agregado de monensina. Luego, las células se someten a una inmunofluorescencia directa para determinar la expresión de CD3, CD4, CD8, DX5 e IFN- γ como se describe en materiales y métodos..

Debido a la gran inhibición del crecimiento obtenida en este protocolo de inmunización profiláctica, de alrededor del 70% (Fig 1A), decidimos tener una aproximación más cercana a lo que sucede en la clínica. Para ello inoculamos el tumor en los ratones y, una vez que éste se estableció, comenzamos las inmunizaciones. De esta forma, a los 5 y 17 días luego del desafío con el tumor C4HD, los ratones fueron inmunizados con células C4HD DN-Stat3 o con células C4HD vector vacío. En la figura 3A se observa que la inmunización con células C4HD DN-Stat3 inhibió el crecimiento tumoral en aproximadamente un 50% al día 37 post-desafío respecto al grupo control

Al realizar los estudios histopatológicos (Fig 3B) observamos que los tumores de animales inmunizados con células C4HD DN-Stat3 tenían un grado histológico menor, más necrosis y fibrosis respecto a los inmunizados con células C4HD vector vacío. Para caracterizar las células infiltrantes del tumor, disgregamos los tumores de sendos grupos experimentales con colagenasa y luego realizamos la determinación de las células T colaboradores (CD3+/CD4+), células T citotóxicas (CD3+/CD8+) y células NK (CD3-/DX5+) con los respectivos anticuerpos fluorescentes para luego analizar los resultados por citometría de flujo. Estos mostraron que los tumores C4HD desarrollado en ratones inmunizados con células C4HD DN Stat3 presentan una tendencia a un mayor infiltrado de células NK respecto de los animales inmunizados con células C4HD vector vacío (Fig 3C).

DISCUSION

En este trabajo hemos descripto, por primera vez, que la inmunización con células tumorales cuya activación de Stat3 fue bloqueada, desencadena una respuesta inmune antitumoral de tipo celular, en la cual tiene participación las células T CD4+ como también las células NK. Este hallazgo es novedoso, ya que las células efectoras de la mayoría de las inmunoterapias son las células T CD8+. A través de los hallazgos observados en el experimento de depleción de células linfoides *in vivo*, podemos concluir que las células CD4+ intervienen activamente en el efecto antitumoral, además de haber demostrado su capacidad de sintetizar IFN- γ en forma específica ante la presencia de células C4HD. Previamente comprobamos que la inmunización con células C4HD DN-Stat3 en ratones *nude* (carentes de linfocitos T pero no de células NK) no protegió contra el desafío con el tumor parental. Estos datos, sumados al hecho que la depleción de NK en animales inmunocom-

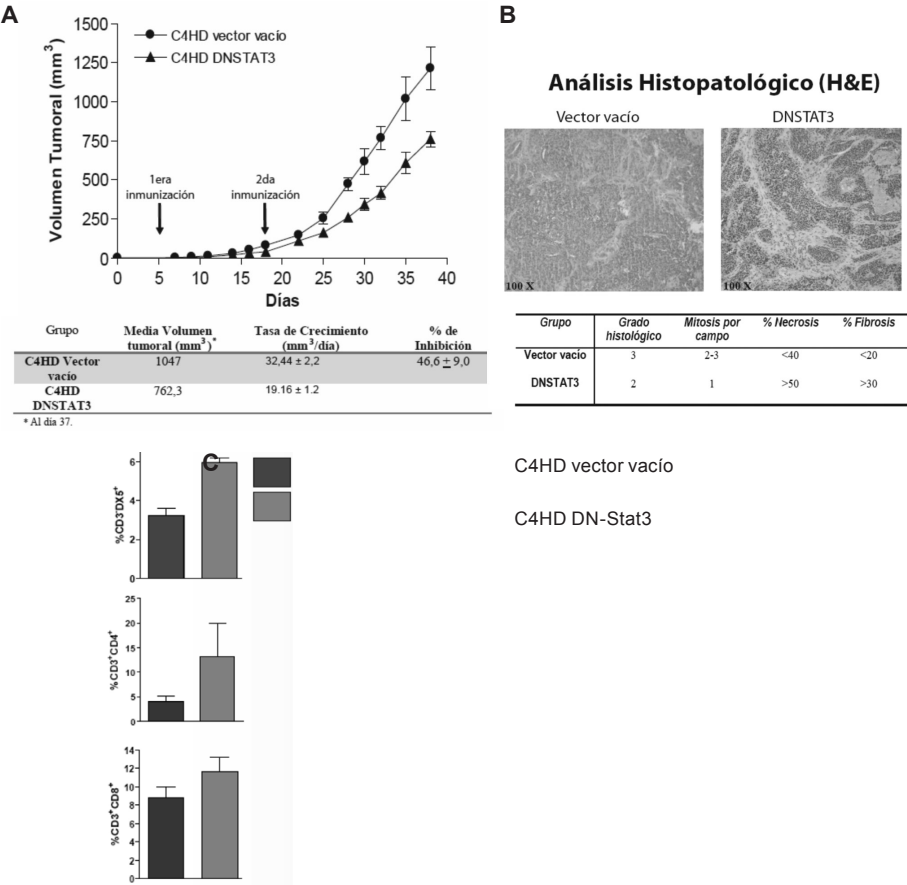


Figura 3. A. Se desafiaron ratones Balb/c con tumor C4HD en presencia de MPA y, luego de 5 días, cuando el tumor fue palpable, se inmunizó con células C4HD DN-Stat3 y con células C4HD vector vacío como control. A los 17 días se repitió la inmunización. Se monitoreó el crecimiento tumoral a lo largo del tiempo **B.** Al día 37 los animales se sacrificaron y se realizó un estudio histopatológico del tumor con H&E, observándose grandes áreas de fibrosis y necrosis en los tumores inmunizados con células C4HD DN-Stat3. Además se observan formación de túbulos, lo que implica un menor grado histológico que el tumor proveniente de los animales inmunizados con células C4HD vector vacío. **C** Con parte de los tumores se obtuvieron las células infiltrantes de tumor que se caracterizaron con los anticuerpos anti CD4, CD8, CD3 y DX5 para comprobar la presencia de células NK (panel superior), T CD4+ (panel central) y T CD8+ (panel inferior) por citometría de flujo.

petentes bloqueó la capacidad anti-tumoral de la inmunización con células C4HD DN-Stat3, sugiere que estas células NK necesitan interactuar con las células T CD4+ para poder obtener su capacidad citotóxica y síntesis de IFN-g. Cabe aclarar que hemos determinado en nuestro laboratorio que las células NK, provenientes de animales inmunizados con células C4HD DN-Stat3, son citotóxicos no sólo sobre la línea celular Yac-1 (blanco clásico de células NK) sino también sobre las células C4HD, a través de ensayos de liberación de ^{51}Cr (datos no mostrados).

Al realizar el protocolo de inmunización terapéutico, observamos una importante inhibición del crecimiento tumoral (~ 50%). Además nos encontramos con algo sumamente llamativo, ya que el grado histológico fue menor en los tumores de ratones inmunizados con C4HD DN-Stat3 respecto a los inmunizados con células C4HD vector vacío. Esto implica que el tumor es más diferenciado y más benigno. Además es de destacar que este tumor tiene más necrosis y fibrosis, lo que implica que la masa tumoral remanente neta es mucho menos que el 50% observado por medición y que el tumor residual presenta menor tasa proliferativa comparación con el control. Estos resultados plantean la posibilidad de poder tener una herramienta más de intervención terapéutica en casos en que los tumores posean la vía de Stat3 activada.

ABSTRACT

Stat3 is active in most of cancer cells and it is known that disruption of Stat3 signaling can overcome tumor immune evasion. We have demonstrated that progestins induce Stat3 activation in human cancer cell lines and in the murine progestin-dependent C4HD cells. We designed an immunotherapy based on the administration of irradiated breast cancer cells that express a dominant negative (DN) form of Stat3 that provides protection against wild-type C4HD tumor in a prophylactic protocol. Now our focus is disclosing the lymphocyte subsets involved in the antitumoral response *in vivo* and evaluating the therapeutic effect of DNStat3 C4HD cells against tumor progression. Our results show that *in vivo* depletion CD4⁺ or NK cells completely abrogated resistance to tumor challenge induced by immunization with DNStat3-transfected C4HD cells. However, depletion of CD8⁺ T cells did not affect C4HD tumor rejection. We demonstrated that TCD4+ and NK cells from mice immunized with DNStat3-C4HD cells were able to synthesize IFN-g in presence of C4HD cells in comparison to control group.

In order to evaluate if this vaccination is effective in the inhibition of growth of an established C4HD breast tumor, we administrated irradiated DNStat3-transfected C4HD cells in a therapeutic manner. Our results showed that after C4HD tumor was palpable, Balb/c mice immunized with DNStat3-transfected C4HD cells experienced significant inhibition of tumor growth (~50%) as compared with mice injected with empty vector-transfected C4HD cells. The histopathological features, analyzed by hematoxylin–eosin staining of histological sections, showed that tumors from animals immunized with DNStat3 C4HD-transfected cells presented a lower histological grade, more necrosis and fibrosis and a significantly lower mitotic index as compared to control tumors.

Our results suggest that administration of tumor immunogens derived from DNStat3-transfected breast cancer cells generate significant CD4⁺ and NK cell-dependent immune responses and significant therapeutic effect against breast cancer cells.

REFERENCIAS

1. Buettner R, Mora LB, Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res* 2002; 8(4):945-954.
2. Yu H, Jove R. The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(2):97-105.
3. Real PJ, Sierra A, De Juan A, Segovia JC, Lopez-Vega JM, Fernandez-Luna JL. Resistance to chemotherapy via Stat3-dependent overexpression of Bcl-2 in metastatic breast cancer cells. *Oncogene* 2002; 21(50):7611-7618.
4. Pollett JB, Trudel S, Stern D, Li ZH, Stewart AK. Overexpression of the myeloma-associated oncogene fibroblast growth factor receptor 3 confers dexamethasone resistance. *Blood* 2002; 100(10):3819-3821.
5. Niu G, Heller R, Catlett-Falcone R, Coppola D, Jaroszeski M, Dalton W et al. Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor in vivo. *Cancer Res* 1999; 59(20):5059-5063.
6. Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, Shain K, Zhang S et al. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med* 2004; 10(1):48-54.
7. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in

- healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 288(3):321-333.
8. Schillaci R, Salatino M, Cassataro J, Proietti CJ, Giambartolomei GH, Rivas MA et al. Immunization with murine breast cancer cells treated with antisense oligodeoxynucleotides to type I insulin-like growth factor receptor induced an antitumoral effect mediated by a CD8+ response involving Fas/Fas ligand cytotoxic pathway. *J Immunol* 2006; 176(6):3426-3437.
 9. Proietti C, Salatino M, Rosembli C, Carnevale R, Pecci A, Kornbliht AR et al. Progestins induce transcriptional activation of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) via a Jak- and Src-dependent mechanism in breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 2005; 25(12):4826-4840.
 10. Lanari C, Molinolo AA, Pasqualini CD. Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c female mice. *Cancer Lett* 1986; 33(2):215-223.
 11. Watson CJ, Miller WR. Elevated levels of members of the STAT family of transcription factors in breast carcinoma nuclear extracts. *Br J Cancer* 1995; 71(4):840-844.
 12. Diaz N, Minton S, Cox C, Bowman T, Gritsko T, Garcia R et al. Activation of stat3 in primary tumors from high-risk breast cancer patients is associated with elevated levels of activated SRC and survivin expression. *Clin Cancer Res* 2006; 12(1):20-28.
 13. Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 2007; 7(1):41-51.

DESARROLLO DE NUEVOS COMPUESTOS DE ORIGEN NATURAL EN EL TRATAMIENTO DE INFLAMACIONES BRONQUIALES, BAJO EL MODELO DE LA FIBROSIS QUÍSTICA

Adrián Alberto Vojnov

Instituto de Ciencia y Tecnología "Dr. Cesar Milstein"-CONICET

INTRODUCCION

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad autosómica causada por mutaciones en un sólo gen ubicado en el brazo largo del cromosoma 7, que codifica para una proteína denominada proteína reguladora de la conductancia de transmembrana de la fibrosis quística cuya sigla en inglés es CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) (Brennan and Geddes, 2002). Las alteraciones en el gen de CFTR afectan las células epiteliales de diversos órganos, siendo la insuficiencia pulmonar la complicación más seria de la FQ debido a las infecciones bacterianas crónicas que se establecen en el individuo (Mishra y col., 2005). La adquisición de *P. aeruginosa* en los individuos afectados se asocia al deterioro clínico (Wilson, 1998), debido a que induce un proceso inflamatorio persistente, y una vez que la infección crónica se establece resulta difícil erradicarla aún con una terapia antimicrobiana significativa (Doering y col., 2000).

La continua utilización de antimicrobianos lleva a la selección de bacterias resistentes con un mayor nivel de tolerancia contra un amplio espectro de antibióticos. En consecuencia, el desarrollo de nuevos antimicrobianos que actúen sobre bacterias resistentes son de primordial importancia.

Romarinus officinalis L. (Labiatae), conocido comúnmente como romero, es una de las especies de hierbas de la familia *Labiaceae*. Esta planta crece en muchas partes del mundo y sus hojas son utilizadas como saborizante y aromatizante de comidas, y también como una fuente de antioxidantes para la conservación de alimentos (Altinier y col., 2007)(Moreno y col.,2006). Se han identificado muchos compuestos presentes en las hojas de romero entre ellos los fenoles como: ácido carnósico, carnosol, rosmarol, 7- metil-epi-rosmanol, metil carbonosato, flavonoides entre los que se encuentran el rosmarínico y cafeico, además de aceites volátiles y terpenoides entre otros (Ibáñez y col.,

2003). El efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de *R. officinalis* se conoce desde hace tiempo, debido a la gran cantidad de publicaciones existentes (Luqman y col., 2007) (Fu y col., 2007). Sin embargo la información sobre las posibles actividades de los extractos no volátiles es escasa.

Estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio y en otros, mostraron que estos compuestos no-volátiles presentan actividad antimicrobiana, anti-tumoral y anti-inflamatoria (Peng y col., 2007) (Aggarwal y col., 2006) (Lo y col., 2002). No obstante no hay publicaciones que muestren su acción frente a patógenos resistentes a la terapia antimicrobiana como por ejemplo sobre *P. aeruginosa* provenientes de pacientes con fibrosis quística (FQ) y otras cepas como *S. aureus*, *E. coli* y *Burkholderia*. Tampoco se cuenta con información sobre su acción en conjunto con antibióticos de uso frecuente en los individuos con FQ, ni análisis histopatológicos que muestren su acción anti-inflamatoria in situ.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos de un extracto etanólico de romero preparado en nuestro laboratorio. Se determinó su actividad antimicrobiana sobre aislados de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes con FQ y otras cepas bacterianas y además se demostró su acción anti-inflamatoria empleando un modelo inflamatorio *in vivo* y su confirmación por análisis histológico.

OBJETIVOS DEL PROYECTO:

- Evaluar la actividad antimicrobiana de extractos de hojas de la planta de *Rosmarinus officinalis* L.
- Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos de romero utilizando el modelo de inhibición de edema de orejas de ratón, cepa murina Balb/c, estimulados con ésteres de forbol (PMA).
- Purificación de los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana y antiinflamatoria.

RESULTADOS OBTENIDOS:

Actividad antimicrobiana del romero:

Se prepararon extractos de romero etanólico y acuosos, mediante la utilización de un soxhlet y a partir de hojas frescas de la planta. Los mis-

mos fueron analizados a través de cromatografía HPLC equipado con una columna de fase reversa C-18. La presencia de AR, AC y COH fue detectada y cuantificada. Estos extractos se utilizaron para evaluar su actividad sobre aislados de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes con Fibrosis Quística y otras cepas bacterianas.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de extractos obtenidos a partir de hojas de *Romarinus officinalis* L (romero). Los microorganismos utilizados consistían en 6 aislados clínicos de *P. aeruginosa*, algunos de los cuales presentaron resistencia a alguno de los antibióticos empleados comercialmente para tratar a pacientes con FQ. La actividad de dos extractos de romero, uno etanólico (RE_{TOH}) y otro acuoso (RACU) se evaluaron *in vitro* por el método de macrodilución en agar (Zampini y col., 2005). De los dos, el RE_{TOH} presentó actividad antibacteriana para todos los microorganismos evaluados, donde la CIM no superó los 800 mg/ml, mientras que para el extracto acuoso esta superaba los 10.000 mg/ml.

Actividad anti-inflamatorios del romero

La actividad anti-inflamatoria del RE se evalúa empleando un modelo de inhibición de un edema generado en ambas orejas de la cepa murina Balb/c, estimulados con ésteres de forbol (PMA). Este inductor de inflamación permite obtener una rápida respuesta inflamatoria en un corto tiempo y es por ello que se lo prefiere para estudiar procesos inflamatorios. Resultados preliminares indican que el extracto etanólico de hojas de romero posee una potente actividad anti-inflamatoria. Para dilucidar el/los mecanismo/s de acción que este podría ejercer sobre el proceso inflamatorio, se desarrolló la preparación de RNA de la piel de ratón sometida a los diferentes tratamientos, con el objetivo de evaluar, mediante reacciones RT-PCR, cual o cuales mediadores de inflamación (como ser citoquinas proinflamatorias) se encuentran alterados en su expresión debido a la acción del extracto. Con este objetivo es que se han adquirido en este período, el reactivo Trizol (preparación de RNA) y distintos ADN sintéticos (cebadores o primers) y enzimas para la realización de la RT-PCR. Utilizando el modelo de inhibición de un edema generado en ambas orejas de la cepa murina Balb/c, estimulados con ésteres de forbol (PMA), se demostró que extractos etanólicos de hojas de romero poseen una potente actividad antiinflamatoria. En el presente periodo, se procedió a la purificación de los compuestos mayoritarios con el objetivo de determinar cual o cuales de ellos son responsables de esa actividad. Con ese objetivo, un extracto etanólico fue analizado por HPLC utilizando una columna C-18,

Los compuestos aislados resultaron ser: ácido carnosico, carnosol y ácido rosmarinico.

Nuevamente, utilizando el modelo murino, se determinó la capacidad de revertir un proceso antiinflamatorio crónico producido por el éster de forbol PMA.

Análisis histopatológicos de los tejidos tratados

El análisis histopatológico de secciones transversales, utilizando hematoxilina y eosina como colorante de tinción, reveló una marcada infiltración de leucocitos y ulceración epidérmica en los tejidos tratados con PMA, siendo esto característico de la infección aguda que no se observa en los tejidos no tratados. Pre-tratamiento con RE etanólico, disminuyó mucho la acumulación de leucocitos. Además, se observó vasodilatación similar a la observada con indometacina, mostrando el efecto protector del etanol RE. El efecto de los compuestos bioactivos importantes se comprobó con CA. La reducción de la migración de leucocitos se observó claramente cuando estos compuestos se aplican tópicamente.

3.4. Reducción de la producción de óxido nítrico de ser romero y sus compuestos bioactivos

Compuestos capaces de reducir la producción de NO por iNOS son interesantes los agentes anti-inflamatorios. Por esta razón, el efecto de la energía renovable etanol y los más activos de CA en la actividad iNOS se ensayó (Maiuri et al., 2005). La estimulación de células J774 con LPS durante 18 h no dio lugar a la generación y el nitrito (NO₂⁻) la acumulación en los medios de comunicación (Kleinert et al., 2004). macrófagos J774 línea celular fueron pre-incubadas con 12, 25 y 50 mg / ml de etanol RE o 3,125, 6,25 y 12,50 mg / ml de CA, y luego activar con 5 mg / ml de LPS durante 24 h. Como se muestra en la figura. 3, ambos, etanólico RE y CA inhibió significativamente la producción de NO en función de la dosis. Los efectos citotóxicos de la etanólico RE y CA fueron evaluados en la presencia o ausencia de LPS. Ambos RE y CA no afectan a la viabilidad celular de las células J774 en las concentraciones utilizadas (datos no mostrados). Estos resultados indican que el etanol OD y CC tienen un potente efecto inhibitorio sobre la síntesis de NO.

3.5. CA y CS reducen la expresión del ARNm pro-inflamatorias

Técnica de RT-PCR se utilizó para medir el nivel de ARNm de varios genes asociados con la inflamación, después de CA y el tratamiento previo CS piel y después de la aplicación de PMA.

Control de la piel del oído, sin tratamiento, mostró los ARNm de los genes constitutivos como la COX-1, la fibronectina y G3PDH como se esperaba. La expresión inducible de genes pro-inflamatorios no haya sido o ligeramente detectado (Fig. 4).

Por el contrario, el tratamiento PMA considerablemente inducida de IL-1 β y TNF α y el gen COX-2 ARNm. pretratamiento de la piel con 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de CA o CS suprimió la IL-1 β expresión nivel que muestra una reducción de la inflamación del 67,64% y 65,06%, respectivamente. Por otra parte, la acción del CA en el nivel de expresión TNF α era más fuerte que el CS (53% frente al 18,2%, respectivamente) y ambos compuestos totalmente inhibir la COX-2. Los niveles de expresión de la COX-1, ICAM-1 y fibronectina no se redujeron significativamente, por la aplicación tópica de CA y CA, en comparación con el grupo de PMA-tratado.

CONCLUSIONES

La FQ es una enfermedad compleja y su gran complicación está asociada a la afectación del aparato respiratorio. Los medicamentos disponibles al día de hoy son múltiples y variados, y se ajustan a cada tipo de paciente. (Lyczak y col., 2002). Diversos grupos de investigación están focalizados en desarrollar nuevas estrategias que permitan mejorar la calidad de vida de los pacientes con FQ. (Kuhn, 2001) (Hoiby, 2002) (Davis 2002) (Cantón y col., 2005).

En los últimos años se incrementó la investigación de fitoquímicos (Cowan, 1999) (Vattem y col., 2007) a partir de plantas medicinales de uso tradicional y la identificación de sus compuestos bioactivos con propiedades antimicrobianas y anti-inflamatorias.

En este trabajo mostramos que un extracto etanólico obtenido a partir de hojas de *R. officinalis*, posee actividad anti-microbiana sobre los aislados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes pacientes con FQ y sobre otras cepas como *S. aureus* y *B. cepacia*, además se evidenció que este extracto potencia significativamente la actividad antimicrobiana de la tobramicina cuando *P. aeruginosa* crece en cultivo planctónico. Su acción anti-inflamatoria *in vivo*, estudiada bajo el modelo de inducción de edema por PMA, pudo ser

confirmada por los estudios histológicos mostrando una marcada reducción leucocitaria, como así también la reducción de óxido nítrico en macrófagos murinos J774.

En este momento estamos finalizando estudios con ácido carnósico uno de los principales compuestos bioactivos identificados en el R_{ETOH} , con resultados muy alentadores, proponiendo a este compuesto como el responsable de las acciones anti-microbianas y anti-inflamatorias de los extractos orgánicos de romero. Si bien estamos en una etapa básica de la investigación, nuestro desafío consistirá seguir en la búsqueda de nuevas futuras terapéuticas dirigidas tanto a impedir y/o erradicar la infección bacteriana como también disminuir o controlar la inflamación para evitar el daño pulmonar y mejorar la sobrevida de estos pacientes.

ABSTRACT

Cystic Fibrosis (CF) is a complex disease and its major complication is to be associated with respiratory diseases. Several research groups are focused on developing new strategies to improve the quality of life of patients with CF. We evaluated the effects of extracts and purified compounds from fresh leaves of *Rosmarinus officinalis* L. Our study showed that an ethanolic extract obtained from leaves of *R. officinalis* L. and purified compounds from it have anti-microbial activity on clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from CF patients and other strains as *S. aureus* and *B. cepacia* also showed that this extract is significantly potentiate the antimicrobial activity of the tobramycin on *P. aeruginosa* grown in culture in planktonic conditions, being the active compounds the carnosic acid (CA) and carnosol (CS). The anti-inflammatory activity was also evaluated, CA and CS, inhibited phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced ear inflammation. We studied the anti-inflammatory mechanism of these compounds, we analyzed the in vivo expression of several inflammation-associated genes in mouse skin by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Our data showed that CA and CS reduced the expression of IL-1 β and TNF- α but had less effect on fibronectin and ICAM-1 expression. Interestingly, both compounds selectively inhibited COX-2 but not COX-1. Histopathological analysis of hematoxylin and eosin (H&E)-stained tissue revealed a marked reduction in leukocyte infiltration and epidermal ulceration of PMA-treated ears when ears were pre-treated with ethanolic extracts or pure CA. In vitro, we showed that ethanolic extract, carnosic acid and carnosol significantly inhibited the overproduction

of nitric oxide (NO) in a dose-dependent manner in the RAW264.7 murine macrophage cell line. For the first time in vivo, we showed that CA and CS differentially regulate the expression of inflammation-associated genes, thus demonstrating the pharmacological basis for the anti-inflammatory properties reported for CA and CS.

BIBLIOGRAGIA

1. Aggarwal BB, Ichikawa H, Garodia P, Weerasinghe P, Sethi G, Bhatt ID, Pandey MK, Shishodia S, Nair MG (2006) From traditional Ayurvedic medicine to modern medicine: identification of therapeutic targets for suppression of inflammation and cancer. *Expert Opin Ther Targets* 10: 87-118
2. Altinier G, Sosa S, Aquino RP, Mencherini T, Della Loggia R, Tubaro A (2007) Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. *J Agric Food Chem* 55: 1718-1723
3. Canton R, Cobos N, de Gracia J, Baquero F, Honorato J, Gartner S, Alvarez A, Salcedo A, Oliver A, Garcia-Quetglas E (2005) Antimicrobial therapy for pulmonary pathogenic colonisation and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect* 11: 690-703
4. Cowan M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. (1999). *Clinical Microbiology reviews* 12: 564-582
5. Davies Jane C. New therapeutic approaches for cystic fibrosis lung disease (2002). *J of the royal society of medicine. Supplement No. 41 Vol.95*
6. Doring G, Conway SP, Heijerman HG, Hodson ME, Hoiby N, Smyth A, Touw DJ (2000) Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur Respir J* 16: 749-767
7. Hoiby N (2002) New antimicrobials in the management of cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* 49: 235-238
8. Ibanez E, Kubatova A, Senorans FJ, Cavero S, Reglero G, Hawthorne SB (2003) Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. *J Agric Food Chem* 51: 375-382
9. Kuhn RJ (2001) Formulation of aerosolized therapeutics. *Chest* 120: 94S-98S
10. Lo AH, Liang YC, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JK (2002) Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase

- through down-regulating nuclear factor-kappaB in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 23: 983-991
11. Luqman S, Dwivedi GR, Darokar MP, Kalra A, Khanuja SP. (2007) Potential of rosemary oil to be used in drug-resistant infections. *Altern. Ther. Health Med.* 13:54-9.
 12. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB (2002) Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 15: 194-222
 13. Moreno S, Scheyer T, Romano CS, Vojnov AA (2006) Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radic Res* 40: 223-231
 14. Peng CH, Su JD, Chyau CC, Sung TY, Ho SS, Peng CC, Peng RY. (2007) Supercritical fluid extracts of rosemary leaves exhibit potent anti-inflammation and anti-tumor effects. *Biosci Biotechnol Biochem.* 71(9):2223-32.
 15. Wilson R, Dowling RB (1998) Lung infections. 3. *Pseudomonas aeruginosa* and other related species. *Thorax* 53: 213-219
 16. Zampini, I.C., Vattuone, M.A., and Isla, M.I. (2005) Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* Cav. ethanolic extracts. *J Ethnopharmacol* 102: 450-456.
 17. Vatter, D.A., Mihalik K., Crixell S.H , and McLean R.J.C. (2007) Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors *Fitoterapia* 78 302–310.