
Anales

de la Fundación

Alberto J. Roemmers

Volumen XXVI

Libro de edición Argentina

Es propiedad
Derechos reservados.
© 2014, 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

ÍNDICE

SUBSIDIOS 2011-2013

Introducción	13
CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE UN MÓDULO TRANSCRIPCIONAL ASOCIADO AL CONTROL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE ZFP36 EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER DE MAMA M. C. Abba	15
ROL DE LA ASTROGLÍA EN EL PROCESO NEURODEGENERATIVO CEREBRAL EN UN MODELO DE RATÓN TRANSGÉNICO PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A UN AMBIENTE ENRIQUECIDO J. Beauquis; A. Vinuesa; P. Pavía; C. Pomilio; F. Saravia	17
LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA DE CÉLULAS B: EL PAPEL DE LAS SEÑALES QUE BRINDAN LOS LINFOCITOS T ACOMPañANTES EN LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD M. Borge; P. R. Nannini; M. Giordano; R. Gamberale	26
ROL DE ERITROPOYETINA (EPO) Y SU RECEPTOR (EPO-R) EN RELACIÓN CON LA HIPOXIA Y ANGIOGÉNESIS TUMORAL EN CARCINOMA DE CELULAS RENALES HUMANAS N. C. Brandan; M. V. Aguirre; C. Zimmermann; J. Mansur; J. D. Espada; J. S. Todaro; T. Stoyanoff	34
REGULACIÓN DE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE CALCIO L. R. M. Brun	49
ROL DE LA INFLAMACIÓN SISTÉMICA EN LA PATOLOGÍA GENERADA POR TUMORES MURINOS J. Bruzzo Iraola	53

ROL DE RECEPTORES ADRENÉRGICOS EN MODELOS TUMORALES Y NO TUMORALES DE MAMA HUMANA. A. Bruzzone; L. Gargiulo; E. Rivero; S. Copsel; C. Davio; I. Luthy	57
BÚSQUEDA DE PRINCIPIOS ACTIVOS INHIBIDORES DE BOMBAS DE RESISTENCIA A MULTIDROGAS (MDR) A PARTIR DE PLANTAS NATIVAS DEL CENTRO DE ARGENTINA UTILIZANDO UN MODELO DE CÉLULAS LINFOBLÁSTICAS DE LEUCEMIA AGUDA CON SOBREEXPRESIÓN DE P-GLICOPROTEI (P-GP). M. C. Carpinella	70
ESTUDIO DEL EFECTO TERAPÉUTICO DE ENTEROCOCCUS FAECALIS CECT7121 SOBRE MODELOS DE ALERGIA. M. S. Castro; A. M. Díaz; A. C. Mourelle; M. A. Molina; M. A. Manghi	77
IMPORTANCIA DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA EN LA REGULACIÓN DE LOS PROCESOS DE OSTEOGÉNESIS, OSTEOCLASTOGÉNESIS Y RESORCIÓN ÓSEA EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA AVANZADO. N. A. Chasseing; V. B. Fernández-Vallone; L. M. Martinez; V. Labovsky; R. H. Bordenave; L. Feldman; E. Batagelj; F. Dimase; A. Rodriguez Villafañe	86
ESTRATEGIAS PARA DESENMASCARAR LA INMUNOGENICIDAD DE UN TUMOR MURINO NATURALMENTE NO INMONOGÉNICO. P. Chiarella	94
ESTUDIO DE LA MOVILIZACIÓN DE FOSFATIDILSERINA EN LA MEMBRANA DE OVOCITOS FERTILIZADOS Y SU RELEVANCIA PARA LA ACTIVACIÓN DEL DESARROLLO. D. J. Cohen; A. Curia; M. Gómez Elías; P. S. Cuasnicú	104
MECANISMOS DEL DOLOR NEUROPÁTICO Y SU MODULACIÓN POR HORMONAS SEXUALES ENDÓGENAS. POSIBLES APLICACIONES TERAPÉUTICAS. M. F. Coronel	112

IMPLICANCIAS DEL GEN FMR1 EN LA FISIOPATOLOGÍA DEL OVARIO L. Dain; I. Ferder	122
ESTUDIO DEL INFILTRADO LINFOCITARIO EN UN MODELO DE REGRESIÓN TUMORAL INDUCIDA INMUNOLÓGICAMENTE G. I. Dran	131
MELATONINA Y SU INFLUENCIA EN LA FUNCIÓN TESTICULAR: UN ESTUDIO DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN Y SU POTENCIAL RELEVANCIA EN PATOLOGÍAS GONADALES M. B. Frungieri; S. P. Rossi; S. Windschuettl; M. E. Matzkin; C. Terradas; R. Ponzio; E. Puigdomenech; O. Levalle; R. S. Calandra; A. Mayerhofer	144
EFFECTO REGULATORIO SOBRE EL NEUROTROFISMO DE LAS INMUNOFILINAS FKBP51 Y FKBP52 M. D. Galigniana; H. R. Quintá; C. Daneri-Becerra	152
DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DE UNA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL PARA EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA INFECCIÓN POR LOS RETROVIRUS HTLV-1 Y HTLV-2 S. V. Gallego; G. M. Castro; M. C. Balangero; E. Maturano; A. Mangeaud	163
LOS ANTIPSICÓTICOS Y EL DESARROLLO DE DIABETES: ESTUDIO EN DOS MODELOS EXPERIMENTALES DEFICIENTES EN EL RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D2 I. A. García Tornadu	169
EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL AL ETANOL SOBRE EL BALANCE HIDROSALINO. CARACTERIZACIÓN DEL SUSTRATO NEUROANATÓMICO M. A. Godino; J. C. Molina	173
MECANISMOS CELULARES IMPLICADOS EN EL MANTENIMIENTO DE LA INTEGRIDAD CROMOSÓMICA FRENTE A LOS VENENOS DE ADN TOPOISOMERASA II α M. B. González Cid	177

ROL DE LA VIA DE SEÑALIZACIÓN NOTCH EN CÉLULAS OVÁRICAS TUMORALES G. Irusta	186
CONTRIBUCIÓN DE NEUTRÓFILOS EN LA ELIMINACIÓN DE UNA INFECCIÓN BACTERIANA EN UN MODELO MURINO DE TOLERANCIA AL LPS V. I. Landoni	196
EL ROL DEL RECEPTOR ROR1 Y LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT EN EL DESARROLLO Y PROGRESIÓN DE MELANOMA P. López Bergami; N. Fernández	201
ROL DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS EN LA MALIGNIZACIÓN CELULAR Y LA PROGRESIÓN TUMORAL M. G. Lombardi; P. Martínez Pulido; M. Oroño; A. Español; M. E. Castro; M. E. Sales	212
CARACTERIZACIÓN DE LAS POBLACIONES INHIBITORIAS / REGULATORIAS EN UN MODELO TUMORAL. ESTUDIO DEL ROL DE LOS LINFOCITOS B A. F. Maglioco; G. Camicia	225
EFFECTO DEL ÁCIDO TRANS-RETINOICO COMO TRATAMIENTO UTILIZADO EN UN MODELO MURINO DE INMUNOSUPRESIÓN ASOCIADO A PROCESOS INFECCIOSOS D. Martire Greco	232
ASOCIACIÓN ENTRE FACTORES GENÉTICOS Y EL RIESGO DE DESARROLLAR SÍNDROME URÉMICO HEMOLITICO (SUH) EN PACIENTES PEDIÁTRICOS LUEGO DE UNA INFECCIÓN CON E.COLI PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA (STX). DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL GEN DEL RECEPTOR DE FRACTALQU C. A. Panek; G. G. Cabrera; M. P. Mejías	242

INTERACCIÓN ENTRE LOS GENES DE LOS COMPLEJOS PROTECTOR Y NO PROTECTOR DE TELÓMEROS EN CÉLULAS DE MIELOMA MÚLTIPLE. CORRELACIÓN CON ACTIVIDAD DE TELOMERASA Y LONGITUD TELOMÉRICA J. Panero; F. Stella; G. Maciel; I. Slavutsky	249
ESTUDIO DE FENOTIPOS CONDUCTUALES Y MECANISMOS CELULARES DESENCADENADOS POR NICOTINA EN MODELOS ANIMALES DE ADICCIÓN V. Pastor; X. Kedikian	251
RELEVANCIA DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN MEDIADAS POR FGFR Y RECEPTORES HORMONALES EN EL CRECIMIENTO TUMORAL DE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA HUMANO METASTÁSICAS Y HORMONO RESPONDEDORAS C. P. Piñero	254
ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO DE OBESIDAD MATERNA ADQUIRIDA POR DIETA PARA EL ESTUDIO DE DEFECTOS CARDÍACOS CONGÉNITOS EN LA PROGENIE M. C. Pustovrh; E. Elia; S. Ginenco; P. Marantz; D. Paz	257
SINAPSIS VIROLÓGICA MACRÓFAGO-GLIA COMO EVENTO DISPARADOR DEL ENVEJECIMIENTO CELULAR Y LA NEURODEGENERACIÓN PRECOZ INDUCIDA POR LA INFECCIÓN POR HIV J. Quarleri; D. Ojeda; M. I. Berria	266
PARTICIPACIÓN DE LAS QUIMIOQUINAS EN EL DESARROLLO DEL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH) M. V. Ramos; M. J. Abrey Recalde	280
ESTRATEGIAS PARA REVERTIR LA INMUNOSUPRESIÓN INDUCIDA POR ENDOTOXINAS BACTERIANAS M. B. Rearte	287

ROL DE LOS MEDIADORES LIÍDICOS EN LAS FUNCIONES DEL TROFOBlasto DE PRIMER TRIMESTRE. BÚSQUEDA DE POSIBLES BLANCOS FARMACOLÓGICOS PARA EL MEJORAMIENTO DE LA TASA DE IMPLANTACIÓN M. L. Ribeiro; M. Sordelli; J. Beltrame.	298
MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LOS PROCESOS DE ACTIVACIÓN Y APOPTOSIS DE PMN INDUCIDA POR AISLADOS CLÍNICOS DE MTB PREVALENTES EN NUESTRO PAÍS M. M. Romero	305
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR HEPÁTICO MRP3 (ABCC3) POR ETINILESTRADIOL. IMPLICANCIAS EN LA TERAPÉUTICA CON ESTRÓGENOS M. L. Ruiz; J. P. Rigalli; A. Arias; S. S. M. Villanueva; C. Banchio; M. Vore; A. D. Mottino; V. A. Catania	314
EFFECTO DE LA HIPERSECRECIÓN CRÓNICA DE LA HORMONA GONADOTROFINA CORIÓNICA HUMANA SOBRE EL METABOLISMO GLUCÍDO Y LIPÍDICO: ESTUDIO EN UN MODELO DE RATONES TRANSGÉNICOS S. B. Rulli; G. Stevens	321
INFLUENCIA DE LOS RECEPTORES DE LA ANAFILOTOXINA C5A EN LA MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR CEPAS LOCALES DE MYCOBACTERIUM MULTIRRESISTENTES A DROGAS C. A. Sabio y García; A. González	330
CÁNCER DE PRÓSTATA Y TEJIDO ADIPOSEO. ESTUDIO DEL MICROAMBIENTE LOCAL Y DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL TEJIDO ADIPOSEO PERIPROSTÁTICO Y CÉLULAS EPITELIALES TUMORALES PROSTATICAS P. A. Sacca; V. Pistone	341

ROL DE LOS IODOLÍPIDOS COMO REGULADORES DEL CRECIMIENTO NORMAL Y PATOLÓGICO DE LA GLÁNDULA TIROIDES L. Thomasz	343
ESTUDIO DE REGULADORES DEL CICLO CELULAR DURANTE EL ESTABLECIMIENTO DE LA PREÑEZ. SU REGULACIÓN POR RECEPTORES ESTEROIDEOS Y ERK1-2 ACTIVADA; Y SU PARTICIPACIÓN EN LA IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA Y EL DESARROLLO DE LA DECIDUA EN RATAS G. Vallejo; A. C. Mestre-Citrinovitz; P. Saragüeta	353
CADHERINA EPITELIAL Y SU RELACIÓN CON LA PROGRESIÓN TUMORAL. EVALUACIÓN DE LAS ALTERACIONES EN SU EXPRESIÓN Y ESTRATEGIAS PARA LA DETECCIÓN DE NUEVOS MODULADORES EN EL CÁNCER DE ENDOMETRIO M. Vazquez-Levin; M. Rosso; M. J. Besso; M. F. Abascal; L. Lapyckyj; E. Aparicio.	359
DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA INMUNOLÓGICA UTILIZANDO UNA CEPA VACUNAL DE <i>SALMONELLA</i> TYPHI ATENUADA, PARA EL TRATAMIENTO DE METÁSTASIS HEPÁTICAS EN UN MODELO MURINO. A. Vendrell; C. I. Waldner.	366
SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO: UN PROBLEMA DE TRANSPORTE. EFECTO DE LA TOXINA SHIGA SOBRE CÉLULAS ENDOTELIALES DEBIDO AL INGRESO POR MACROPINOCITOSIS Y/O ENDOCITOSIS MEDIADA POR RECEPTORES D. L. Viale	377
RECONSTITUCIÓN DE LA BARRERA QUÍMICA INTESTINAL POR ENTEROGLUCAGON TIPO GLUCAGON-LIKE PEPTIDE 2 (GLP-2) S. S. M. Villanueva; A. Arias; V. G. Perdomo; J. P. Rigalli; M. L. Ruiz; V. A. Catania; A. D. Mottino	385





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 2011–2013, 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 mas 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 investigación a lo largo de todo el país en temas de Investigación Básica, Aplicada y de Epidemiología y Salud Pública



CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE UN MÓDULO TRANSCRIPCIONAL ASOCIADO AL CONTROL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE ZFP36 EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER DE MAMA.

Dr. Martín Carlos Abba

Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas (CINIBA), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata.

RESUMEN

El gen ZFP36 (conocido como *Tristetraprolin - TTP*) codifica a una proteína de unión a sitios ARE (AUBP) involucrada en la regulación post-transcripcional negativa de diversos genes relacionados con la progresión tumoral. La expresión ZFP36 se encontraría dramáticamente suprimida en diversos tipos de tumores sólidos como el cáncer de mama. Para comprender los mecanismos que rigen la regulación de la expresión de ZFP36 en las células mamarias, el objetivo del presente estudio fue identificar y caracterizar el módulo transcripcional asociado con la expresión de dicho gen. Nuestros resultados indican que ZFP36 está altamente expresada en el epitelio mamario normal en humanos y ratones, estrechamente asociada al grado de diferenciación celular. También observamos que, al menos en la glándula mamaria de ratón, durante la lactancia se induce la expresión de Zfp36. Los resultados experimentales e *in silico* de nuestro grupo nos conducen a inferir que el gen ZFP36 se encontraría bajo la regulación transcripcional y post-transcripcional concertada de un módulo de genes evolutivamente conservado entre especies, compuestos por: JUN, JUNB, FOS, FOSB, EGR1, IER2, NR4A1, DUSP1 y BTG2. A partir de nuestros datos postulamos que la expresión de ZFP36 y el módulo de genes asociados podrían estar involucrados en el proceso de diferenciación de la glándula mamaria y su inhibición conjunta estaría asociada a la progresión del cáncer de mama. Creemos que este módulo de genes poseería valor pronóstico, permitiendo estratificar a los pacientes con cáncer de mama en estadios temprano en grupos de buena o mala evolución de la enfermedad.

ABSTRACT

ZFP36 (also known as *Tristetraprolin* - *TTP*) is a RNA-binding protein that inhibits the expression of pro-inflammatory cytokines and invasiveness-associated genes. ZFP36 levels are decreased in many different cancer types and it has been proposed that this protein could be used as a prognostic factor in breast cancer. Here, using experimental (QRT-PCR and IHC) and *in silico* data analysis, we determined that ZFP36 mRNA is present in normal breast cells and its levels are significantly decreased in all breast cancer subtypes. In addition, by immunostaining, we found that ZFP36 expression is higher in normal breast tissue and benign lesions than in infiltrating carcinomas. Among these, lower grade tumors showed increased ZFP36 expression compared to higher grade cancers. In mice, we found that ZFP36 mRNA and protein expression is also diminished in mammary tumors. ZFP36 expression was also induced in mammary HC11 cells treated with lactogenic hormones, mainly by prolactin. More importantly, we identified a gene expression signature co-expressed with *ZFP36* (composed by *JUN*, *JUNB*, *FOS*, *FOSB*, *EGR1*, *IER2*, *NR4A1*, *DUSP1* and *BTG2*) among normal and breast cancer samples that could be involved in ZFP36 expression at transcriptional and postranscriptional levels. In summary, these studies show that *ZFP36* expression is strongly linked to the mammary differentiation program in human and mice, suggesting that this protein might play specific and relevant roles in the normal physiology of the gland and cancer development.

ROL DE LA ASTROGLÍA EN EL PROCESO NEURODEGENERATIVO CEREBRAL EN UN MODELO DE RATÓN TRANSGÉNICO PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A UN AMBIENTE ENRIQUECIDO.

Juan Beauquis, Ángeles Vinuesa, Patricio Pavía, Carlos Pomilio,
Flavia Saravia.

Laboratorio de Neurobiología del Envejecimiento, Instituto de Biología y Medicina
Experimental (IBYME), CONICET, Vuelta de Obligado 2490, Buenos Aires.

En el presente trabajo de investigación se estudiaron aspectos del remodelamiento de áreas del cerebro ligadas al aprendizaje y a la memoria en respuesta a la exposición a un ambiente enriquecido en el contexto del proceso neurodegenerativo. Se analizó el efecto de la exposición a estímulos sensoriales, sociales, motores y cognitivos sobre el hipocampo del ratón transgénico PDAPP-J20, modelo de la enfermedad de Alzheimer (EA). Se partió de la hipótesis que propone que la experiencia induce cambios en el sistema nervioso central modulando poblaciones celulares neuronales y gliales y la expresión de factores neurotróficos así como aspectos cognitivos y conductuales.

Se estudiaron los cambios gliales presentes en el hipocampo de ratones transgénicos para la proteína precursora del amiloide (APP), considerados un modelo de la enfermedad de Alzheimer. Los ratones transgénicos y sus controles fueron expuestos a un ambiente enriquecido (EE) o a un ambiente estándar de bioterio (SC) de los 5 a los 8 meses de edad para evaluar la posible regulación de la morfología glial por parte de estímulos ambientales. Además, se evaluó una población de ratones transgénicos y no transgénicos de 5 meses de edad, representativos de las condiciones experimentales iniciales.

En el hipocampo en particular se estudió la relación entre los distintos componentes del nicho neurovascular en el giro dentado, región en la cual ocurre el proceso de neurogénesis adulta. Células de la glía, neuronas y vasos sanguíneos interactúan a través de conexiones físicas y neuroquímicas para proveer un ambiente adecuado para la generación, maduración e integración de nuevas neuronas. La alteración de cualquiera de los componentes del nicho neurovascular tendrá impacto en el resultado del proceso de neurogénesis y en los procesos cognitivos y conductuales asociados.

Los estudios se llevaron a cabo utilizando ratones PDAPP-J20 y sus hermanos no transgénicos como controles de 5 y 8 meses de edad y se aplicaron diferentes protocolos (figura 1). Se realizó la eutanasia a los 5 o a los 8 meses de edad con el objetivo de determinar cambios presentes en el hipocampo en una etapa previa y en otra posterior al inicio del depósito de placas amiloides. La exposición al EE se realizó durante 3 meses desde los 5 a los 8 meses de edad.

Diseño experimental

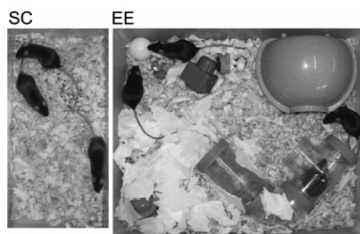
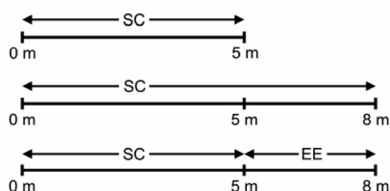


Figura 1. Protocolos experimentales y fotografías de las jaulas utilizadas. En un primer grupo de ratones se realizó el análisis de los cambios hipocámpales a los 5 meses de edad luego de estar en un ambiente estándar de bioterio (SC). En un segundo grupo de ratones se realizó la eutanasia y el posterior análisis a los 8 meses de edad utilizando un subgrupo que permaneció desde el nacimiento hasta los 8 meses en SC y otro subgrupo que estuvo alojado en SC hasta los 5 meses de edad y en un ambiente enriquecido desde los 5 hasta los 8 meses (Figura original en Beauquis et al., 2013).

ANÁLISIS DE LA PATOLOGÍA AMILOIDE CEREBRAL Y EFECTOS DEL ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL

Se realizó un análisis del contenido de los péptidos amiloides A β 1-40 y 1-42 en homogenatos de cerebro mediante la técnica de ELISA y se cuantificó el número de placas amiloides en el hipocampo mediante tinción con rojo Congo. A los 5 meses se encontraron valores muy bajos de los niveles cerebrales de ambos péptidos A β en los Tg y no se detectó señal en los NTg (figura 2 A y B). A los 8 meses se vio un aumento en los niveles de los péptidos y se detectó una disminución significativa asociada a la exposición al EE ($P < 0,01$ vs. Tg SC). En la cuantificación del número de placas amiloides por la técnica de rojo Congo (figura 2 C y E) se encontró que a los 5 meses la mayoría de los animales Tg no tienen depósitos de A β en la región CA1

del hipocampo y que a los 8 meses es posible detectar un gran número de placas. El EE no tuvo un efecto significativo sobre este parámetro. También se cuantificó la carga amiloide, definida como el porcentaje de área de CA1 ocupado por placas, y se vieron cambios en el mismo sentido que para el número de placas (figura 2 F).

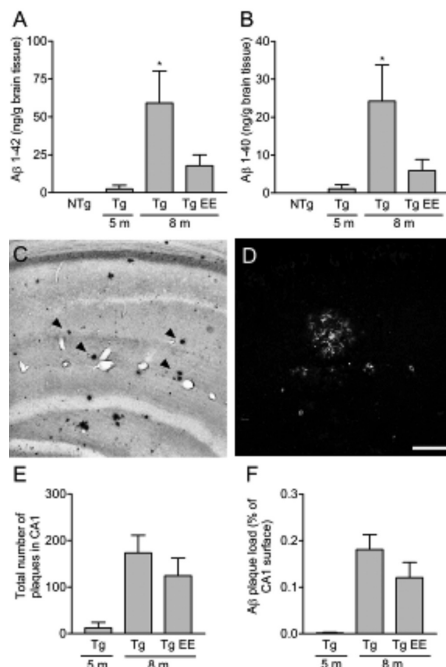


Figura 2. Estudio de la patología amiloide. A y B. ELISA del contenido cerebral de los péptidos Aβ 1-40 y 1-42. A los 5 m se detectaron niveles muy bajos de ambos péptidos mientras que a los 8 m ocurrió un aumento significativo (*P < 0,01). El ambiente enriquecido (EE) se asoció a una reducción de los niveles de péptidos Aβ (*P < 0,01). C. Microfotografía del hipocampo donde se ven placas amiloides (puntas de flecha) detectadas por la técnica de rojo Congo. D. Placas amiloide en el hipocampo detectada por inmunofluorescencia para Aβ. E y F. Cuantificación del número de placas (E) y de la carga amiloide (F) en CA1. Se detectó un aumento a los 8 meses pero no se vio un efecto del EE (Figura original en Beauquis et al., 2013).

EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN AL AMBIENTE ENRIQUECIDO SOBRE LA NEUROGÉNESIS ADULTA

Se estudiaron las etapas de la neurogénesis adulta mediante la cuantificación de las células Ki67+ (proliferación), BrdU+NeuN+ (diferenciación neuronal), DCX+ (maduración) y BrdU+ (supervivencia). En la cuantificación de las células Ki67+ se encontró una menor proliferación en los animales transgénicos con respecto a los controles (efecto del genotipo $P<0,01$; figura 3 A), sin efectos significativos del EE. Al comparar el número de células BrdU+NeuN+ se encontró un efecto significativo del genotipo disminuyendo en los animales Tg ($P<0,01$; figura 3 B).

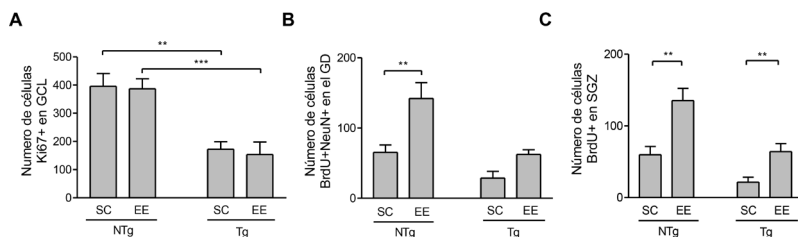


Figura 3. A. Proliferación celular en la capa de células granulares (GCL) del hipocampo medida por el número de células Ki67+. Se encontró una disminución del número de células en los animales transgénicos (Tg; $**P<0,01$; $***P<0,001$). B. Diferenciación neuronal. Los Tg presentaron un menor número de células BrdU+NeuN+ y la exposición al ambiente enriquecido (EE) tuvo un efecto solo en los NTg ($**P<0,01$). C. La supervivencia celular disminuyó en los Tg y el EE provocó un aumento en ambos genotipos ($**P<0,01$).

La exposición al EE se asoció a un aumento de la diferenciación neuronal en los controles ($P<0,01$) pero no en los Tg. La supervivencia celular, medida a través de la cuantificación de las células BrdU+ 21 días después de su administración, disminuyó en los animales Tg (efecto del genotipo $P<0,01$; figura 3 C). En ambos genotipos se encontró un aumento de la supervivencia celular en aquellos grupos expuestos al EE (efecto del ambiente $P<0,001$).

La maduración de las nuevas neuronas se determinó mediante la cuantificación de las células positivas para doublecortin (DCX). Se contaron aquellas células que mostraron una morfología de célula madura (Beauquis et al., 2010b). Se encontró un menor número de células DCX+ maduras en los animales Tg y la exposición al EE se asoció a un aumento solamente en los animales NTg (figura 4).

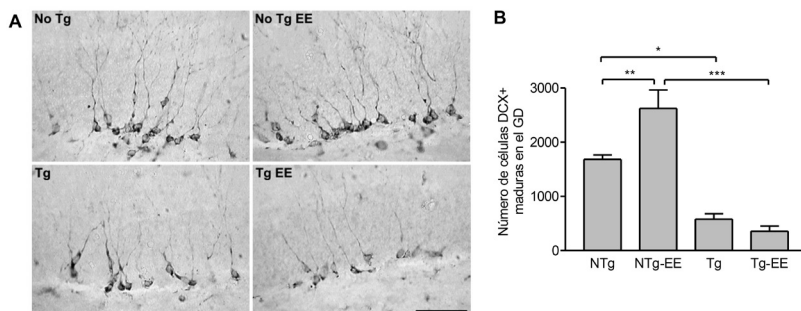


Figura 4. A. Microfotografías de la inmunohistoquímica para DCX en el GD de los 4 grupos experimentales. B. Número de células DCX+ maduras en el giro dentado (GD). En los NTg se encontró un aumento asociado al EE y los Tg mostraron un menor número de células maduras.

CARACTERÍSTICAS DE LA ASTROGLÍA EN EL HIPOCAMPO DE LOS RATONES PDAPP-J20

Se cuantificó el número de astrocitos GFAP+ en el área CA1 del hipocampo a los 5 y a los 8 meses sin encontrar diferencias entre los grupos experimentales (figura 5).

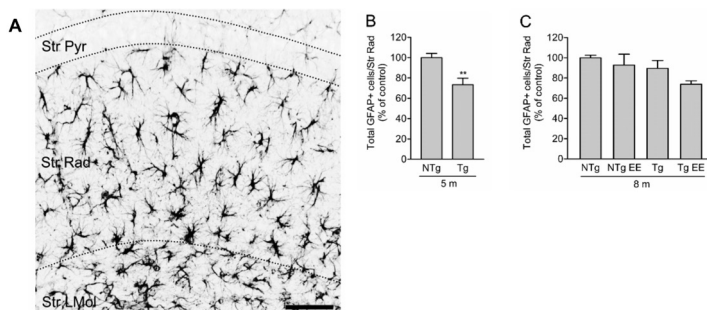


Figura 5. A Microfotografía de astrocitos en la región CA1 del hipocampo detectados mediante inmunohistoquímica para GFAP. B y C. Cuantificación del número de astrocitos GFAP+ en los animales de 5 y 8 meses (expresado como % del control). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales (Figura original en Beauquis et al., 2013).

Además, se analizó el volumen celular de los astrocitos GFAP+ en el hipocampo mediante reconstrucción tridimensional a partir de imágenes de microscopía confocal (figura 6 A-D). A los 5 meses (figura 6 E), no se encontraron diferencias significativas entre NTg y Tg. A los 8 meses de edad, dada la presencia de depósitos hipocampales de A β , el análisis se dividió en 2 poblaciones de astrocitos de acuerdo a la distancia a las placas: asociados (PA) y no asociados (NPA). Aquellos astrocitos NPA mostraron un volumen menor que los astrocitos control ($P<0,01$) mientras que en los Tg expuestos al EE hubo un aumento significativo ($P<0,01$), llegando a niveles similares al NTg (figura 6 F). Los astrocitos PA a las placas mostraron un volumen significativamente mayor que los controles ($P<0,01$) y la exposición al EE no tuvo un efecto significativo.

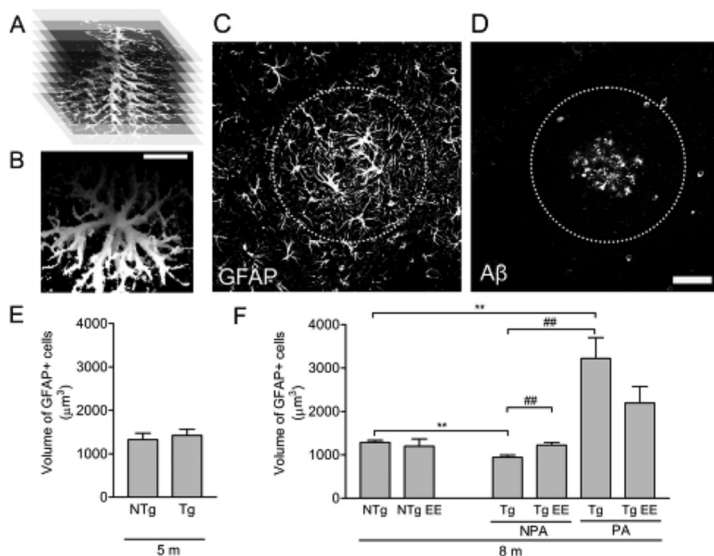


Figura 6. A y B. Reconstrucción 3D de un astrocito GFAP+ a partir de imágenes de microscopía confocal. C y D. Inmunofluorescencia para GFAP (C) y A β (D) indicando el sector asociado a placa (PA) dentro de la línea de puntos y el no asociado a placa (NPA) por fuera. E y F. Cuantificación del volumen celular astrocitario a los 5 m (E) y 8 m (F). A los 8 m los astrocitos NPA mostraron menor volumen que los NTg y el EE se asoció con un aumento significativo (** y ## $P<0,01$). Los astrocitos PA mostraron un aumento de volumen con respecto al control (** $P<0,01$) sin efecto del EE (Figura original en Beauquis et al., 2013).

Utilizando la técnica de Sholl se determinó la complejidad de los astrocitos hipocampales. El análisis se realizó utilizando una imagen promedio de múltiples planos de confocal para cada astrocito GFAP+ sobre la cual se superpuso la grilla de círculos concéntricos del análisis de Sholl (Figura 7 A). La cuantificación de las intersecciones demostró que existe un aumento de la complejidad astrocitaria en los Tg en SC con respecto a los controles ($P < 0,0001$ para 5 meses y para PA 8 meses y $P < 0,05$ para NPA; figura 7 B-D) y que el EE tuvo un efecto disminuyendo la ramificación tanto en Tg NPA como en NTg ($P < 0,0001$). En los PA no hubo efecto del EE.

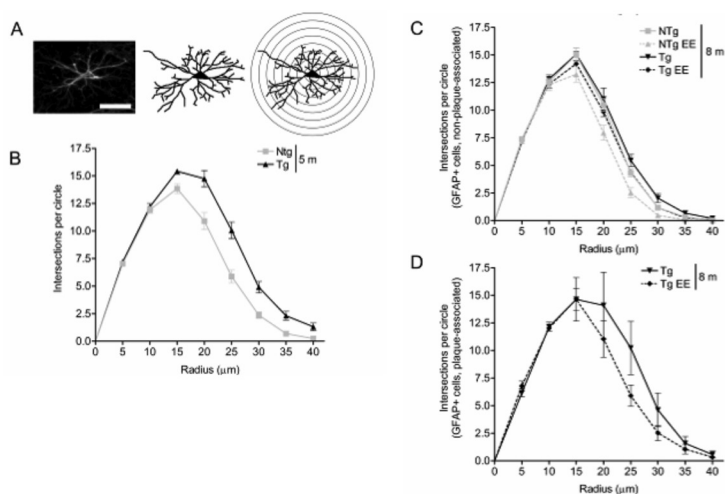


Figura 7. A. Análisis de Sholl sobre una imagen promedio por astrocito GFAP+ a partir de planos de confocal. B-D. Re-presentación gráfica de la ramificación de procesos GFAP+ a los 5 (B) y 8 meses (NPA en C y PA en D). En los Tg se encontró una mayor complejidad. El EE redujo la ramificación en los NTg y en los Tg NPA. En los astrocitos PA, el EE no tuvo un efecto significativo.

A partir de los resultados obtenidos podemos concluir que en el ratón PDAPP-J20 existen alteraciones tanto en poblaciones neuronales como astrocitarias hipocampales que podrían subyacer a los déficits cognitivos descritos en esta patología. Es interesante señalar que algunas de estas alteraciones tienen un inicio precoz en el desarrollo de la enfermedad y que podrían ser útiles como indicadores tempranos. Además, la exposición a

un ambiente enriquecido fue capaz de regular no solo la supervivencia de neuronas jóvenes en el hipocampo, fenómeno que había sido descrito en el envejecimiento, sino también el contenido cerebral de péptidos beta amiloide y el volumen y la complejidad astrocitarios. Los resultados indicarían que existen al menos dos poblaciones astrocitarias cuya morfología se encuentra diferencialmente afectada en el ratón transgénico para APP dependiendo de la relación con los depósitos de A β y que los estímulos ambientales son capaces de ejercer un efecto sobre la morfología glial, principalmente revirtiendo la disminución de volumen encontrada en la población astrocitaria lejana a las placas. Paralelamente a los cambios de volumen encontramos una disminución del número de astrocitos GFAP+ en la región CA1 del hipocampo de los animales Tg en SC que fue revertido por el enriquecimiento ambiental, sin ejercer efectos en los animales controles. Teniendo en cuenta los datos de la cuantificación del número placas, los efectos del ambiente no estarían mediados por una modulación del depósito de A β .

Resta estudiar cuáles serían los mediadores de este efecto y determinar si la respuesta astrocitaria está asociada a cambios neuronales o si es un fenómeno independiente que indicaría una respuesta directa de los astrocitos a estímulos ambientales.

ABSTRACT

In the present work we studied aspects of brain remodeling in response to environmental enrichment (EE) in a neurodegenerative context. We analyzed the effect of sensorial, social and motor stimuli on the hippocampus of PDAPP-J20 mice, model of Alzheimer's disease (AD). Transgenic (Tg) and control (NTg) mice were exposed to an EE that consisted in large cages, with toys, tunnels and shelters that were rearranged every 2 days. Animals were housed in EE or standard cages (SC) from 5 to 8 months of age. A group of 5-month-old mice were studied to evaluate initial conditions. Although at 5 months of age we found very low levels of amyloid peptides and no amyloid deposition, astrocytes were found to be more ramified and decreased in density when compared with control astrocytes. This was accompanied by a reduction in the volume of hippocampus, CA1 pyramidal layer and granular cell layer and decreased number of pyramidal and granular cells. Golgi staining revealed that there were no changes in dendritic spines in pyramidal neurons. Behavioral tests showed increased anxiety and impaired learning in Tg

mice. At 8 months of age, a significant portion of the hippocampus was loaded with amyloid plaques in Tg mice. We identified two distinct astrocyte populations: one hypertrophic and associated to amyloid plaques (PA) and the other atrophic and non-plaque-associated (NPA). Exposure to EE was able to reduce levels of amyloid peptides and to reverse changes in astrocytes and neurogenesis. We conclude that glial and neuronal alterations occur before amyloid deposition in a model of AD and could be considered as early markers of the disease. Exposure to EE was shown to regulate not only neuronal defects but also glial changes. Further research efforts should be done to determine whether this is a primary glial or neuronal effect.

LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA DE CÉLULAS B: EL PAPEL DE LAS SEÑALES QUE BRINDAN LOS LINFOCITOS T ACOMPAÑANTES EN LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD.

Mercedes Borge, Paula Romina Nannini, Mirta Giordano, Romina Gamberale.

Instituto de Medicina Experimental-CONICET-Academia Nacional de Medicina.

SÍNTESIS DEL INFORME FINAL

Introducción y Objetivos del Estudio:

La leucemia linfocítica crónica de células B (LLC) es la leucemia de mayor frecuencia en el Hemisferio Occidental y se caracteriza por la acumulación de linfocitos B clonales CD5. Las células leucémicas proliferan en los tejidos linfoides en íntimo contacto con linfocitos T activados, células estromales y células de tipo nodriza (*nurse like cells*, NLC) dentro de estructuras denominadas centros proliferantes. Allí la célula LLC recibe señales que promueven su proliferación y sobrevida. Entre estas señales se destacan la molécula CD40L expresada por los linfocitos T, la cual interacciona con el CD40 de los linfocitos leucémicos promoviendo su proliferación y sobrevida y la quimiocina CXCL12, producida por células estromales y NLC, la cual favorece la migración y sobrevida del propio clon leucémico. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio demuestran por primera vez que los linfocitos T de los pacientes LLC de buen y mal pronóstico expresan niveles similares de CXCR4, el receptor para CXCL12, a pesar de lo cual la respuesta migratoria es significativamente menor en los linfocitos T de los pacientes de buen pronóstico segregados por la expresión de ZAP-70. Si bien se ha reportado que esta quimiocina es capaz de incrementar la supervivencia del clon leucémico, los efectos sobre la activación y proliferación de los linfocitos T de los pacientes no habían sido estudiados hasta el presente. Dada la importancia de los linfocitos T y del CXCL12 en los procesos que podrían llevar a la progresión de la LLC los objetivos propuestos en este estudio son, por un lado, evaluar el efecto del CXCL12 en la activación de los linfocitos T de los pacientes LLC y por otro lado, el efecto de los linfocitos T activados de esa forma en la sobrevida y proliferación del clon leucémico.

RESULTADOS

El presente estudio fue llevado a cabo con muestras de sangre periférica de pacientes con LLC evaluados al diagnóstico y durante el curso de la enfermedad que son atendidos en los Hospitales Bancario y Álvarez. En todos los casos los pacientes fueron informados acerca de los objetivos del estudio y dieron su consentimiento por escrito. Asimismo el proyecto de investigación ha sido evaluado y aprobado por el Comité de Ética de nuestra Institución.

Tal como mencionamos en la introducción, uno de los objetivos que nos planteamos fue evaluar si el CXCL12 era capaz de aumentar la activación y proliferación de los linfocitos T de pacientes LLC. Para ello realizamos cultivos de células mononucleares totales (CMT) de pacientes LLC en presencia o ausencia de CXCL12 recombinante y los linfocitos T presentes en la muestra fueron activados por entrecruzamiento del TCR/CD3 empleando anticuerpos anti-CD3. Luego de 24 horas de cultivo evaluamos la expresión de los marcadores de activación CD25, CD69 y CD154 (CD40L) sobre la superficie de los linfocitos T CD4 por citometría de flujo. Tal como puede observarse en la **Figura 1** encontramos que la activación inducida por el anti-CD3 de los linfocitos T CD4+ de pacientes con LLC fue significativamente mayor cuando esta se realizó en presencia de CXCL12.

En la **Figura 2** se muestran los histogramas de la expresión de los marcadores de activación de un paciente representativo en las cuatro condiciones de cultivo que mencionamos anteriormente. Estos resultados demuestran que el CXCL12 se comporta como un factor coestimulador para la activación de los linfocitos T de los pacientes LLC.

Luego evaluamos si la mayor activación de los linfocitos T de los pacientes LLC en presencia de CXCL12 repercutía en la activación y proliferación del propio clon leucémico. Para ello las CMT de los pacientes fueron marcadas con CFSE y cultivadas en las cuatro condiciones mencionadas anteriormente. Luego de 7 días de cultivo la proliferación de las células leucémicas se determinó analizando el porcentaje de linfocitos CD19 con CFSE, por citometría de flujo. Como puede observarse en la **Figura 3 A** el porcentaje de linfocitos CD19 CFSE inducido por anti-CD3 fue significativamente mayor cuando en el cultivo se encontraba la quimiocina CXCL12 que en su ausencia. Asimismo, al evaluar el tamaño de los linfocitos CD19 por citometría de flujo, como medida de su activación, encontramos un mayor porcentaje de linfocitos CD19 con tamaño grande en los cultivos con anti-CD3 en presencia de CXCL12 en comparación a los cultivos ausencia de la quimiocina (**Figura 3**

B). En la **Figura 3 C** se muestran histogramas de un paciente representativo.

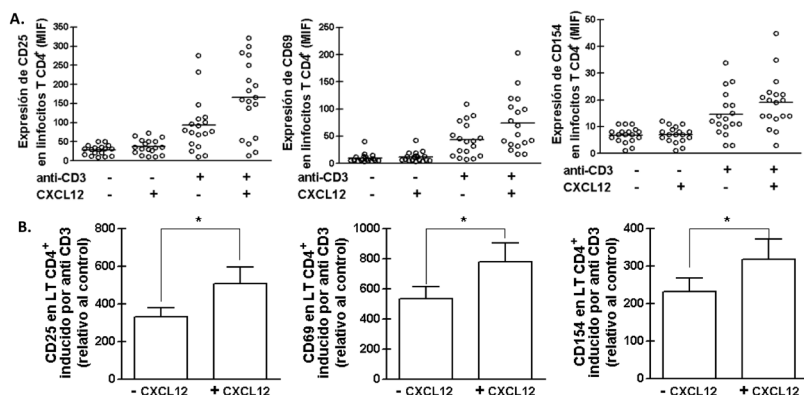


Figura 1. El CXCL12 aumenta la expresión de CD25, CD69 y CD154 sobre los linfocitos T CD4 de pacientes LLC estimulados a través del TCR. Se realizaron cultivos con CMT totales de 18 pacientes con LLC en presencia o ausencia de CXCL12 (1µg/ml) por dos horas y luego fueron sembradas sobre anticuerpos específicos para CD3 (anti-CD3) o el correspondiente control de isotipo inmovilizados en placa. Luego de 24 horas se midió la expresión de CD25, CD69 y CD154 en los linfocitos T (LT) CD4 por citometría de flujo. A. En la figura se muestran los valores de media de intensidad de fluorescencia (MIF) de CD25, CD69 y CD154 para cada paciente. B. Luego los valores obtenidos para cada paciente se utilizaron para calcular el porcentaje de aumento del marcador de activación inducido por anti-CD3 relativo al control sin anti-CD3. Las barras muestran la media $\pm$ ES de los aumentos inducidos por anti-CD3 en ausencia y en presencia de CXCL12. * $p < 0,05$ Wilcoxon signed rank test.

Las células de tipo nodriza o *Nurse like cells* (NLC) son células de estirpe mieloide que se encuentran en los órganos linfáticos de los pacientes con LLC y pueden ser diferenciadas *in vitro* a partir de CMT de pacientes con LLC. Las NLC producen, entre otros factores, altas cantidades de CXCL12. Es por esto que quisimos evaluar si las NLC, a través de la expresión de CXCL12, son capaces de incrementar la activación de los linfocitos T de pacientes con LLC, tal como hemos encontrado para el CXCL12 sintético. La diferenciación de las NLC se realizó tal como fue descrito mediante el cultivo de CMT de pacientes LLC en medio completo por 14 días. En la **Figura 4** se puede observar el fenotipo característico de las NLC: células grandes, adherentes,

redondeadas y rodeadas de linfocitos, además encontramos que se rodeaban no sólo de linfocitos CD19 sino que también los linfocitos T CD4 (flechas blancas) interaccionaban con ellas.

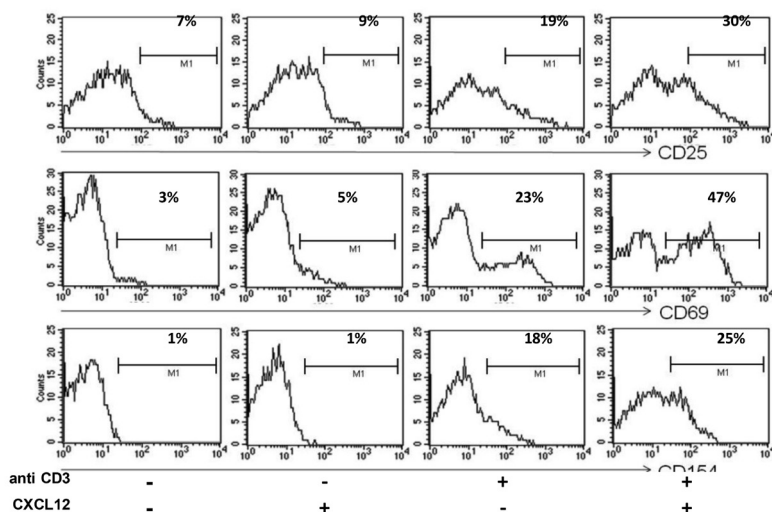


Figura 2. Expresión de CD25, CD69 y CD154 en los linfocitos T CD4 de pacientes con LLC activados en ausencia y presencia de CXCL12. Se muestran los histogramas de la expresión de CD25, CD69 y CD154 sobre los LT CD4 de un experimento representativo. Sobre los histogramas se muestran los porcentajes de células positivas para los marcadores.

Para evaluar el efecto del co-cultivo con NLC en la activación de linfocitos T CD4 de pacientes con LLC, se diferenciaron NLC, luego se descongelaron CMT de pacientes con LLC y se cultivaron sobre NLC autólogas o solas y se activaron o no con partículas de poliestireno cubiertas con anticuerpos anti-CD3 (o el correspondiente control de isotipo). Luego de 24 horas de cultivo encontramos, tal como observamos con el CXCL12 recombinante, que la presencia de NLC aumentaba no solo la activación de los linfocitos T (resultados no mostrados) si no también la proliferación en respuesta al entrecruzamiento del TCR (**Figura 5**).

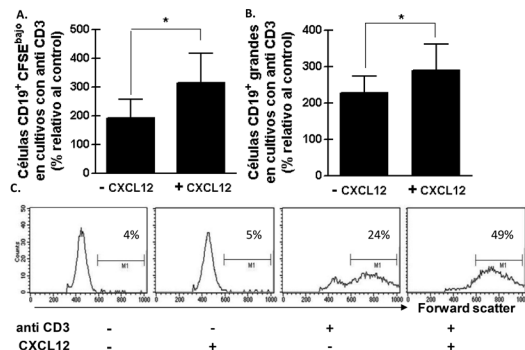


Figura 3. Los linfocitos T CD4⁺ activados en presencia de CXCL12 inducen la activación y proliferación de células leucémicas. A. Se analizó la proliferación de la población CD19 por citometría de flujo luego de 7 días de cultivo. Las barras representan la media $\pm$ ES para el aumento en el porcentaje de linfocitos CD19 CFSE en los cultivos activados con anti-CD3 relativo al control sin activar, en ausencia y presencia de CXCL12. * $p < 0,05$ Wilcoxon signed rank test. B. Se evaluó por citometría de flujo el aumento en el tamaño celular de los linfocitos CD19 en los cultivos activados o no con anti-CD3 en presencia o ausencia de CXCL12. Las barras representan la media $\pm$ ES para el aumento en el porcentaje de linfocitos CD19 con valores de forward scatter mayores a 600 en los cultivos activados con anti-CD3 relativo a los cultivos sin anti-CD3. C. Se muestran los histogramas para el parámetro de forward scatter (tamaño celular) de un experimento representativo. * $p < 0,05$ Wilcoxon signed rank test.

CONCLUSIONES:

En el presente estudio demostramos que el CXCL12 y el contacto con células NLC productoras de CXCL12, incrementan la activación de los linfocitos T CD4⁺ provenientes de pacientes LLC y que esto repercute en una mayor activación y proliferación del propio clon leucémico. Nuestros resultados sugieren que la producción de CXCL12 por parte microambiente presente en los órganos linfoides de los pacientes LLC tendría un papel central en la fisiología de los linfocitos T actuando no sólo como quimioattractante, sino también como un factor de coestimulación para los linfocitos T activados.

Los resultados presentados en este informe dieron lugar a la siguiente publicación: "CXCL12 is a costimulator for CD4(+) T cell activation and proliferation in chronic lymphocytic leukemia patients." *Cancer Immunology, Immunotherapy* : CII. 2013 Jan;62(1):113-24.

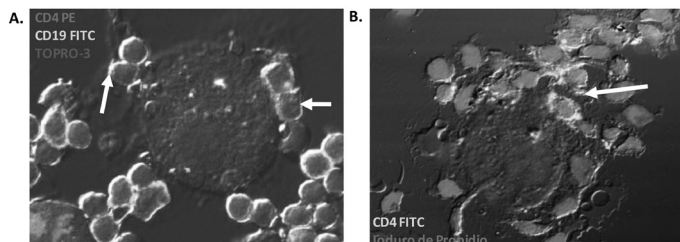


Figura 4. Células de tipo nodriza (NLC) diferenciadas in vitro a partir de células mononucleares totales (CMT) de pacientes con LLC contactan con linfocitos T CD4 autólogos. Se diferenciaron NLC a partir del cultivo de CMT de pacientes con LLC tal como está descrito. Luego se cultivaron por 24 horas con CMT autólogas, se fijaron, se marcaron con anticuerpos específicos para su análisis por microscopía confocal. A. Se utilizaron anticuerpos específicos para CD19 conjugados a FITC y para CD4 conjugado a PE (clon SK3), los núcleos se evidenciaron con TOPRO-3. B. Se utilizaron anticuerpos anti CD4 FITC (clon RPA-T4) y los núcleos se tiñeron con Ioduro de Propidio (IP). Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal FluoView FV1000 con un objetivo 60 X 1.42 NA de inmersión en aceite, las imágenes fueron analizadas utilizando el software de Olympus FV10-ASW. Las flechas blancas muestran LT CD4 en contacto con las NLC.

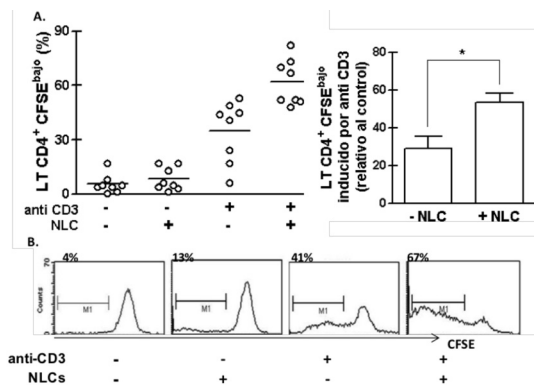


Figura 5. Las células de tipo nodriza (NLC) incrementan la proliferación de linfocitos T CD4 autólogos estimulados a través del TCR. Se sembraron CMT de pacientes LLC marcadas con CFSE sobre NLC autólogas o solas y se trataron con partículas de poliestireno cubiertas con anti CD3 o el correspondiente control de isotipo. Luego de 5 días de cultivo se evaluó la proliferación de

los LT CD4 por citometría de flujo. En los paneles izquierdos se muestran los valores de porcentaje de LT CD4 CFSE de cada paciente LLC. Luego los valores obtenidos para cada paciente se utilizaron para calcular el porcentaje de aumento en el porcentaje de LT CD4 CFSE inducido por anti-CD3 relativo al control sin anti-CD3. Las barras representan la media $\pm$ ES para el aumento en el porcentaje de LT CD4 CFSE inducido por anti CD3 en ausencia o presencia de NLC. * $p < 0,05$ Wilcoxon signed rank test.

ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common leukemia in the Western world, characterized by the accumulation of CD5 clonal B cells in peripheral blood and lymphoid organs. Leukemic B cells proliferate in lymphoid tissues in close contact with activated T cells, stromal cells and accessory myeloid cells, such as nurse-like cells (NLC) which favor CLL cell survival and proliferation. CXCL12 is a highly conserved chemokine produced by stromal cells and NLC, and CXCR4, its main receptor, was shown to induce CLL and T cell migration and leukemic cell activation and survival. The aim of this study was to determine whether CXCL12 may enhance the activation and proliferation of T cells from CLL patients. Thus, PBMC or purified T cells from CLL patients were activated with immobilized anti-CD3 mAb in the presence or absence of CXCL12 and after 24hs of culture, the expression of the activation markers CD25, CD69 and CD154 (CD40L) and the intracellular expression of IFN γ on CD4 T cells was evaluated by Flow Cytometry. We found that the combination of anti-CD3 and CXCL12 significantly increased the expression of all activation markers and the expression of IFN γ beyond that the one induced by anti-CD3 alone. More interestingly, leukemic cell activation and proliferation was enhanced by activated T cells in the presence of CXCL12. In addition, autologous NLC increased the activation and proliferation of CD4 T cells from CLL patients. Altogether, our results prompted us to hypothesize that CXCL12 production by lymphoid tissue microenvironment in CLL patients may play key dual role for T cell physiology, functioning not only as a chemoattractant but also as a costimulatory factor for activated T cells.

REFERENCIAS

1. Granziero L, Ghia P, Circosta P, et al. Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001;97:2777-2783.
2. Kitada S, Zapata JM, Andreeff M, Reed JC. Bryostatins and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 1999;106:995-1004.
3. Burger JA, Burger M, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate

- spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood*. 1999;94:3658-3667.
4. Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*. 2000;96:2655-2663.
 5. Borge M, Nannini PR, Galletti JG, et al. CXCL12-induced chemotaxis is impaired in T cells from patients with ZAP-70-negative chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2010;95:768-775.

ROL DE ERITROPOYETINA (EPO) Y SU RECEPTOR (EPO-R) EN RELACIÓN CON LA HIPOXIA Y ANGIOGÉNESIS TUMORAL EN CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES HUMANO

Dres. Nora Brandan, María V. Aguirre, Carla Zimmermann, Jesús
Mansur, Joaquín D. Espada, Juan S. Todaro, Tania Stoyanoff.

Cátedra de Bioquímica-Facultad de Medicina-UNNE Mariano Moreno

1240-CP.3400-Corrientes TE: 0379-4435378

E-mail: ncbrandan@gmail.com

INTRODUCCIÓN

El carcinoma de células claras renales (CRCC) es el más común de los tumores renales y se asocia conmutaciones del gen supresor tumoral Von Hippel- Lindau (VHL). El carcinoma de células renales (CCR) representa el 3% de los tumores del Adulto y el 95% de las neoplasias malignas del riñón. Aproximadamente al 40% de los pacientes que se les practica la resección quirúrgica, desarrollan metástasis. Debido al incremento en la detección de tumores, con el uso de técnicas de imagen no invasiva, se encuentran un número creciente de CCR incidentales. En el año 2004 la Organización Mundial de la Salud ^[1] reportó tres subtipos histológicos principales de CCR: Células claras, el cuál se desarrolla en las células del túbulo proximal (80-90%), papilar (10-15%) y cromóforo (4-5%). El CCR es considerado uno de los tumores más vascularizados ^[2], esto es debido a alteraciones en el gen supresor del tumor Von Hippel Lindau (VHL). El gen VHL está inactivo por hiper-metilación o mutación en el 75% de los tumores a células claras del CCR. La pérdida de funcionalidad de VHL produce la estabilización del factor de transcripción inducible por hipoxia (Hif-1α) y el aumento de la transactivación de sus genes diana, entre ellos VEGF, implicando la expresión de una serie de proteínas relacionadas con la hipoxia tumoral, entre ellas HIF-1α, EPO y EPO-R.

Vía del VHL-HIF-EPO: El microambiente del tumor es generalmente hipóxico, lo que conlleva la

activación de vías de supervivencia en este estado. Una forma que le permite sobrevivir a la hipoxia es la activación de los Factores Inducibles

por Hipoxia (HIF). Este factor tiene dos subunidades HIF α y HIF β , ambas se encuentran activadas en hipoxia. Cuando el gen VHL está mutado, su forma activa no se puede unir a la E3 ubiquitinaligasa y no forma el complejo con HIF α . Por lo que HIF α no se degrada y se introduce al núcleo celular activando genes inducibles por hipoxia (Fig 1). Así regula la angiogénesis como también la proliferación y la metástasis^[3]. Uno de los genes inducibles por hipoxia es la Eritropoyetina (EPO) como también el VEGF, PDGF, TGF alfa, el Receptor de quimioquina 4 y la anhidrasa carbónica ^[4].

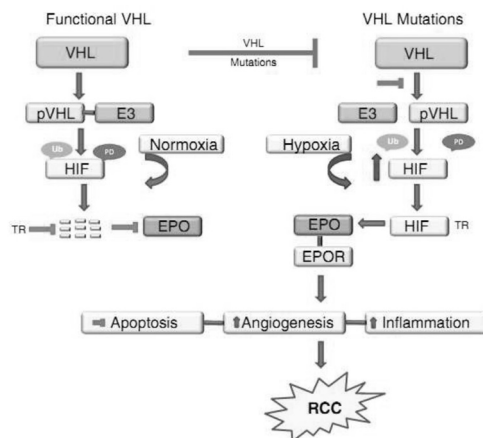


Figura 1: Esquema de señalización del gen VHL WT y mutado (Morais y col. 2013)

Angiogénesis: La angiogénesis, definida como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir del endotelio existente, es un proceso complejo mediado por la interacción entre células tumorales, endoteliales y la matriz extracelular. Ésta neo-vascularización está mediada principalmente por una alteración en el balance entre factores pro y anti angiogénicos. Por lo tanto, actualmente está perfectamente establecido que la angiogénesis es esencial para la invasión y metástasis de las células tumorales. Numerosos estudios han demostrado una fuerte relación entre el grado de angiogénesis y la progresión y metástasis en el CCR ^[5]. El potencial metastásico del CCR se correlaciona directamente con el nivel de expresión de factores pro-angiogénicos que incluyen VEGF, el factor de crecimiento fibroblástico

básico (bFGF), el factor de crecimiento placentario (PIGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), las interleuquinas 6 y 8, el factor de crecimiento epidermal (EGF) y sus receptores. La neoangiogénesis es determinante del crecimiento y la metástasis tumoral, por lo que se le atribuye importante valor pronóstico y terapéutico. En este proceso intervienen entre otras moléculas: VEGF, su principal receptor en las células endoteliales VEGF-R2 y PECAM-1 (CD31), molécula de adhesión presente en muchas células sanguíneas y componente de uniones endoteliales en los capilares.

A pesar de los avances en el tratamiento de CRCC con terapias anti-angiogénicas, todavía hay controversias con respecto a la expresión de sus targets en las células tumorales y en los componentes de la microvasculatura en el microambiente tumoral hipóxico.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio fue investigar el patrón de expresión de moléculas relacionadas con la hipoxia y angiogénesis tumoral: HIF1- α , EPO, EPO-R, VEGF, su receptor (VEGF-R2) y PECAM-1 (CD31) en muestras de tejido tumoral de CRCC (core y zona adyacente) a través de estudios multiparamétricos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras: Secciones de tejido tumoral y distal normal de pacientes sometidos a nefrectomía radical (n=12) provenientes del Servicio de Urología del Hospital J.R.Vidal de Corrientes. Secciones de tumores renales de 5 μ m, fijadas, embebidas en parafina y teñidas con hematoxilina/eosina, fueron evaluadas en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital J.R. Vidal de la ciudad de Corrientes. Para la evaluación de factores anatómicos con implicación pronóstica y estadificación del CCR, se utilizó la clasificación TNM del 2002 recomendada por la UICC (Union for International Cancer Control). Los factores pronósticos histológicos evaluados fueron la graduación nuclear de Fuhrman y el subtipo histológico de acuerdo a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Además, se incluyó información referente a datos clínico-patológicos tales como sexo, edad y tamaño del tumor. No se incluirán otros factores de riesgo que

involucren la historia clínica del paciente. El consentimiento informado fue obtenido de acuerdo a la declaración de Helsinki (2008) en todos los pacientes, contando con la aprobación del Departamento de Investigación del Hospital J.R. Vidal y el aval de la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Facultad de Medicina-UNNE.

Inmunohistoquímica: Secciones de 4 µm de tejido CCR fueron incluidas en parafina. Secciones de 4 µm fueron colocadas en portaobjetos silanizados, pasadas por xileno y concentraciones decrecientes de etanol a través de procedimientos estándares. El desenmascaramiento antigénico se realizó utilizando buffer citrato 0.01 M en 4 ciclos de 5 min en microondas. Luego, las secciones fueron tratadas con H₂O₂ al 3% en metanol inhibir la actividad de peroxidasa endógena. Las muestras fueron bloqueadas utilizando suero normal de caballo (HS) al 10% en buffer fosfato (PBS) durante 30 minutos. Posteriormente, las secciones fueron incubadas con los anticuerpos primarios en cámara húmeda a 4°C durante la noche.

Anticuerpos primarios utilizados: EPO (H162); EPO-R (H-194 Santa Cruz Biotechnology, USA)

dilución 1:100; Bcl-xL (Cell Signaling Technology, USA) dilución 1:300; VEGF (C-1, Santa Cruz Biotechnology, USA); VEGF-R2 (Cell Signaling Technology) dilución utilizada 1:100 y anti PECAM-1 (M-20, Santa Cruz Biotechnology, USA), dilución 1:50.

Para el revelado se utilizó el sistema biotina-avidina-peroxidasa, Kit LSAB (Dako Cytomation) según las instrucciones del fabricante. Para visualizar la inmunomarcación se utilizó el Kit DAB/H₂O₂ (Invitrogen) y se utilizó la tinción con hematoxilina como colorante de contraste tiñendo los núcleos.

Evaluación de la Inmunomarcación: La intensidad del tinte fue evaluado como negativo (0), Leve (+) y Fuerte (++).

Western Blottings: Muestras tumorales CCR como las de secciones distales de las nefrectomías se homogenizaron para la obtención de extractos citosólicos y nucleares según metodología previamente descripta (6). Las proteínas (20-40 µg) fueron fraccionadas por SDS-PAGE (7-12% dependiendo del PM de la proteína a detectar) y fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa que se incubaron con los anticuerpos primarios específicos: EPO-R (M-20) y EPO (H-162) (Santa cruz Biotechnology, USA); HIF-1α (Novus Biological) diluidos de acuerdo a la máxima sensibilidad ajustada

para su detección (1:200-1:500). Se usó β actina (Sigma) como control interno. Posteriormente, se incubaron con los anticuerpos secundarios específicos conjugados con peroxidasa de rábano (Jackson Immunoresearch Inc. USA). Los inmunocomplejos se revelaron con el Kit Opti4CN (BIO-RAD, USA) y fueron analizados con el software Sción Image (NIH).

Detección de Apoptosis in situ: Se utilizó la técnica de TUNEL in situ de acuerdo a los procedimientos incluidos en el Kit Apop Tag (Roche Co) El cálculo del índice apoptótico se realizaron como ha sido previamente descrito (2).

Extracción de ARN y retrotranscripción (RT):

Para el aislamiento del ARN total, se utilizó el reactivo comercial Trizol Reagent siguiendo indicaciones del fabricante y se cuantificó utilizando un espectrofotómetro. La integridad del ARN se analizó por observación en U.V. de las bandas características en electroforesis en geles de Agarosa teñidos con Gel RED. Una vez aislado, cuantificado el ARN y analizado la integridad del ARN, se procedió a la retrotranscripción del mismo utilizando una mezcla de reacción compuesta por una solución tampón (Tris-HCl 7,5mM pH 9; KCl 5mM; (NH₄)SO₄ 2mM; MgCl₂ 3mM), y los reactivos comerciales (Promega): RNasin, como inhibidor de RNasas (20 unidades), cebadores hexámeros con secuencias aleatorias (random primers) (5pmoles), la retrotranscriptasa MMLV (200 unidades), dNTPs (0,2mM), así como 2 μ g de ARN. Para las PCR cualitativas se agregó DTT (5mM) para evitar la formación de estructuras secundarias fueron previamente desnaturalizados a 72°C por 10 minutos. La reacción de RT se llevó a cabo a 37°C por 60 minutos, seguidos de 5 minutos a 95°C para inactivar la retrotranscriptasa. Posteriormente, 5 μ l de cada retrotranscripto fue utilizado como matriz para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

PCR cualitativa

Los retrotranscriptos obtenidos en el apartado anterior son utilizados para la PCR cualitativa. Para ello, utilizamos una mezcla de reacción compuesta por una solución tampón (Tris-HCl 7,5mM pH 9; KCl 5mM; (NH₄)SO₄ 2mM; MgCl₂ 1mM), y DNA polimerasa (1 unidad) y dNTPs (0.4mM).

Los cebadores específicos fueron utilizados a una concentración final de 0.4mM. La amplificación se realizó con un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 7 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación, cada uno de los

cuales constó de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a la temperatura de los primers que se utilizarán y 30 segundos a 72°C. Finalmente un ciclo de 7 minutos a 72°C. La amplificación de los genes específicos, se analizó por migración del DNA en geles de agarosa al 2% teñidos con GEL RED.

RESULTADOS

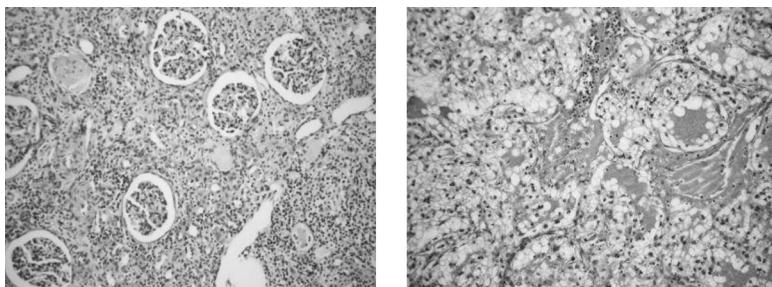


Figura 1. Evaluación histopatológica (tinción H/E) de riñón conservado y tumor renal de células claras. a) Imagen ilustrativa de riñón conservado. b) Imagen Ilustrativa de carcinoma renal de células claras. Se observan éstas células constituidas en grupos con disposición alveolar acompañada de hemorragia y pequeños focos de necrosis (100x).

Tabla 1. Parámetros Clínicopatológicos de pacientes con carcinoma de células renales (CCR) (n=12)

Paciente N°	Sexo	Edad (Años)	Estadío patológico	Nefrectomía (Izq. o Der.)	Tamaño del tumor (cm)	Grado Nuclear (Fuhrman)	Tipo celular
1	F	55	IV	Izquierda	10x9	3	Cel. Claras
2	M	58	Ib	Derecha	5x4	2	Cel. Claras
3	M	50	Ib	Derecha	4,8x4	1	Cel. Claras
4	M	67	Ib	Derecha	5,5x4	2	Cel. Claras
5	F	46	Ib	Izquierda	7x6	2	Cel. Claras
6	M	75	Ib	Derecha	4,5x3	2	Cel. Claras
7	F	47	Ib	Izquierdo	6x7	1	Cel. Claras
8	M	49	II	Izquierda	7x5	2	Cel. Claras
9	F	44	Ia	Derecha	9x5x3,5	2	Cel. Claras
10	F	65	II	Derecha	7,2x5x6	3	Cel. Claras
11	M	68	II	Izquierda	6x6x5	2	Cel. Claras
12	M	69	II	Izquierda	6x6	2	Cel. Claras

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE EPO-R

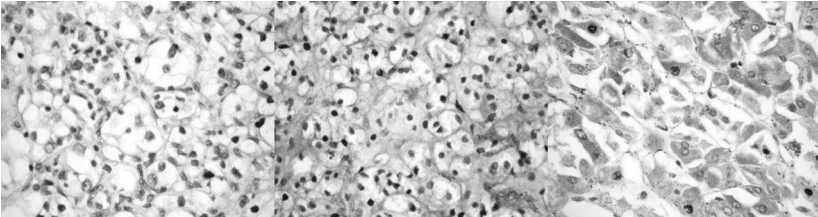


Figura 2. Expresión de Epo-R en el carcinoma de células renales (CCR). (a)Control negativo. Expresión citoplasmática (b) leve y (c) fuerte de Epo-R (H-194, Santa Cruz Biotechnology).

Tabla 2. Expresión inmunohistoquímica de Epo-R en pacientes con CCR.

Tipo tumoral	Expresión de Epo-R					
	0		+		++	
	n	%	n	%	n	%
CRcc	3	23.9	6	50.1	3	26
Total						
12						

CRcc (Carcinoma renal de células claras)

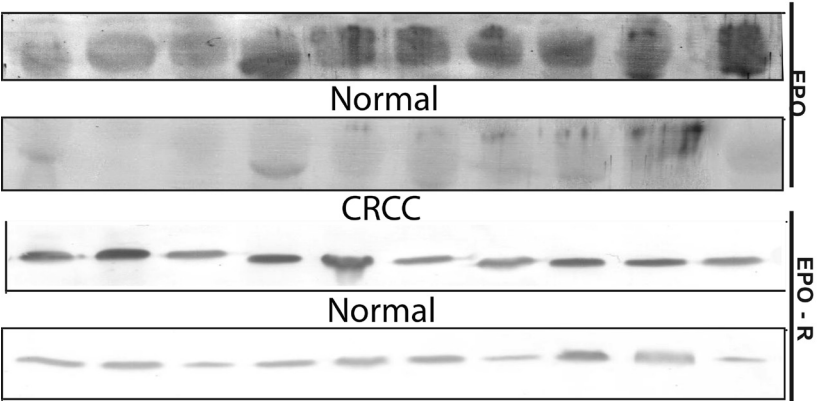


Figura 3. Análisis por Western Blotting de la Expresión de Epo y Epo - R en CCR vs sección distal normal del riñón conservado de 10 pacientes.

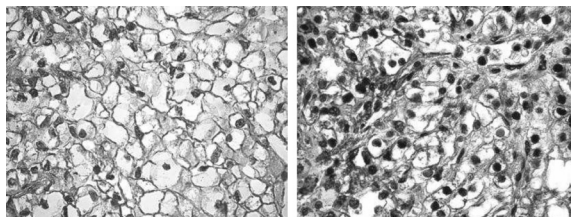


Figura 6. Evaluación de la apoptosis (TUNEL in situ) en carcinoma renal de células claras. A) Imagen ilustrativa de control negativo. B) Imagen ilustrativa de una muestra de CRCC. Se observan células TUNEL + con cromatina condensada o cuerpos apoptóticos. (400x).

EVALUACIÓN DE LA HIPOXIA Y LA ANGIOGÉNESIS

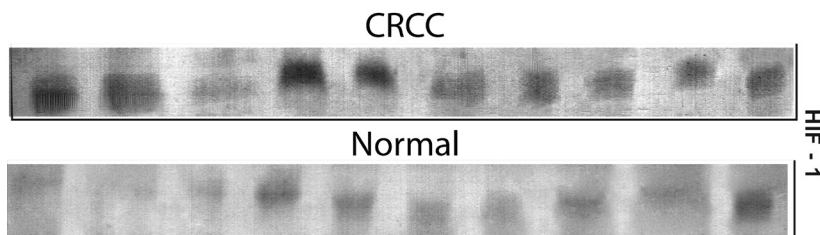
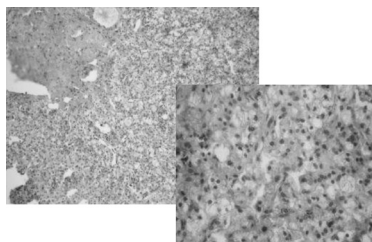


Figura 7. Análisis por Western Blotting de la Expresión de HIF-1 α en CCR vs sección distal normal del riñón conservado de 10 pacientes.

a)



b)

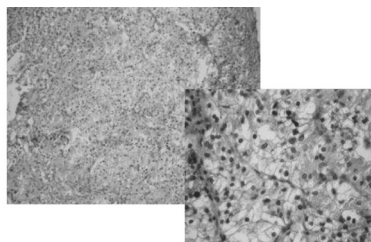


Figura 8. IHQ de VEGF en el carcinoma de células renales (CCRC). a) Tejido adyacente tumoral y b) Core CCRC (x100 y x400 respectivamente)

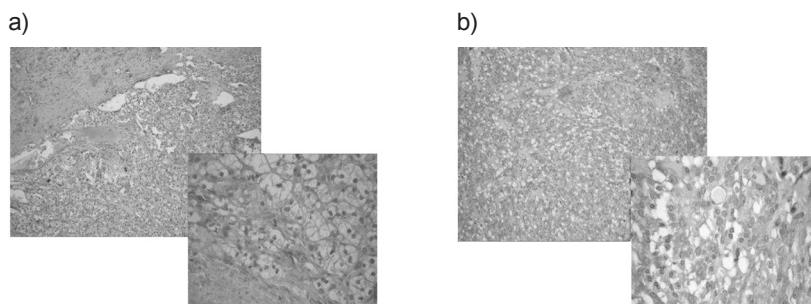


Figura 9. IHQ de VEGF-R2 en el carcinoma de células renales (CCRC). (a) Tejido adyacente tumoral y b) Core de CCRC (x100 y x400 respectivamente).

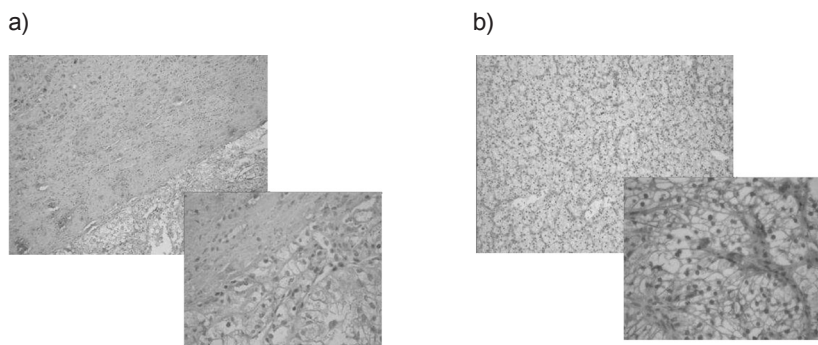


Figura 10. IHQ de PECAM-1 (CD-31) en el carcinoma de células renales (CCRC). (a) Tejido adyacente tumoral y b) Core de CCRC (x100 y x400 respectivamente).

CONCLUSIONES

En nuestra cohorte de pacientes con CCRC hemos hallado:

- Incremento en la expresión del HIF-1 a asociado a la hipoxia tumoral.
- Altos niveles de expresión del par Epo/Epo-R en la totalidad de las muestras estudiadas por Western Blotting.
- Patrones diferenciales de expresión de Epo-R por Inmunohistoquímica (citoplásmica difusa y perimembranosa).

- Alto porcentaje de muestras con moderada e intensa inmunoreactividad para Bcl-xL, poniendo de manifiesto el fenómeno de supervivencia tumoral.
- Un incremento del IA asociados con una mayor graduación de Fuhrman, esto puede deberse a que células tumorales hiperproliferativas serían más susceptibles a la apoptosis pudiendo estar implicada en la progresión del CCRC.
- El aumento de expresión de HIF se asoció con la sobreexpresión de VEGF y VEGF-R2, y por lo tanto, promueve la neoangiogénesis tumoral
- VEGF presenta un patrón citoplásmico difuso en zonas periféricas del tumor y un patrón mixto citoplásmico /membranoso en el core tumoral.
- VEGF-R2 exhibe leve inmunomarcación membranosa en zonas tumorales adyacentes limitado a células endoteliales, e intensa tinción citoplásmica en el core del CCRC.
- PECAM-1 exhibe una marcada inmunomarcación en el core tumoral con respecto a zonas adyacentes indicando el incremento de la microvasculatura.
- Los patrones de VEGF, VEGFR-2 y PECAM-1 fueron similares en todas muestras estudiadas y no pudieron correlacionarse hasta el momento con los parámetros histopatológicos y clínicos.

Estos datos sugieren que la expresión de HIF-1 α , EPO y EPO-R juegan un importante rol en la tumorigénesis del CCRC, indicando que EPO podría actuar como un factor de crecimiento de tipo autócrina en este tipo de tumores. Además, este estudio brinda nuevos aportes acerca de la localización de EPO y EPO-R en CCRC

Adicionalmente, se brindan nuevos aportes acerca de la localización de VEGF, VEGF-R2 y PECAM-1 en la neovascularización del CCRC, restando ampliar la casuística para correlacionar estos patrones de expresión con parámetros clínico-patológicos de progresión tumoral para optimizar la terapia antiangiogénica.

ABSTRACT

Sporadic clear cell renal cell carcinoma (CCRCC) has a poor prognosis and an unpredictable course, since is highly resistant to conventional treatments.

The aim of this project was to investigate the expression of EPO, EPO-R, as well as molecules involved in the hypoxia and tumour angiogenesis (HIF-1 α , VEGF, VEGF-R2 and PECAM) and to analyse the relationships among them.

Samples from patients from the Urology Unit of the J.R.Vidal Hospital (Corrientes, Argentina) (n=12) were used for histopathology assessments and immunohistochemical(IHQ) analysis using a EPO, EPO- R, Bcl-xL, VEGF, VEGF-R2 and PECAM monoclonal antibodies. Detection were performed with biotin- avidin peroxidase complex method and DAB /H₂O₂ .

EPO and EPO-R were also studied by Westernblottings (WB) and RT-PCR. Apoptosis were confirmed by

TUNEL in situ assay. EPO-R was detected by IHQ in 78% of CCRCC, the intensity of membranous immunostaining was categorized as either: 0 (no signal) 23.9%, 1+ (weak) 50.1% or 2+ (strong) 28%. EPO-R mRNA was enhanced in CCRCC compared to distal renal samples. RT-PCR of EPO-R and EPO showed co- expression in most of the CCRCC homogenates by immunoblottings.

Bcl-xL revealed different grades of cytoplasmatic expression: 1+ (18.1 %) and strong 2+ signal (36.4%); revealing a correlation between EPO-R expression and cell survival. HIF α -1 was overexpressed in all samples revealing tumor hypoxia.

TUNEL positive cells correlated with high Furmahn's nuclear grading system and stages of TNM system. This study showed different patterns of VEGF, VEGF-R2 and PECAM comparing the peripheral to the core sections of CCRCC.

This study confirms that the EPO-EPO-R system is related to the hypoxic tumor microenvironment and the triggering of neovascularization. Moreover, this is the first study to demonstrate differential VEGF and VEGF-R2 locations in the peripheries and the core of CCRCC samples.

However, more casuistic is needed for establishing tumor progression related to clinic pathological characteristics. Also, future studies should aim at answering the question of whether different patterns of immunoreactivity of the angiogenic molecules might help select patients for different approaches of VEGF targeted treatment.

REFERENCIAS

1. Eble J.N. S.G., Epstein J.I., Sesterhenn I.A. . Pathology and genetics of tumors of the urinary system and male genital organs. Lyon. : Word Health Organization Classification of Tumors; 2004. Slaton J.W., Inoue K., Perrotte P., El-Naggar A.K., Swanson D.A., Fidler I.J., Dinney C.P.N. (2001) Expression Levels of Genes that Regulate Metastasis and Angiogenesis Correlate with Advanced Pathological Stage of Renal Cell Carcinoma. *The American Journal of Pathology*, vol. 158(2), pp. 735-43.
2. Morais C., Johnson D., Vesey D., Gobe G. (2013) Functional significance of erythropoietin in renal cell carcinoma. *BMC Cancer*, vol. 13(1), pp. 14.
3. Raval R.R., Lau K.W., Tran M.G.B., Sowter H.M., Mandriota S.J., Li J.-L., Pugh C.W., Maxwell
4. P.H., Harris A.L., Ratcliffe P.J. (2005) Contrasting Properties of Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-Associated Renal Cell Carcinoma. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 25(13), pp. 5675-86.
5. Rioux-Leclercq N., Fergelot P., Zerrouki S., Leray E., Jouan F., Bellaud P., Epstein J.I., Patard J.-J. (2007) Plasma level and tissue expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma: a prospective study of 50 cases. *Human Pathology*, vol. 38(10), pp. 1489-95.
6. Kyotani Y., Ota H., Itaya-Hironaka A., Yamauchi A., Sakuramoto-Tsuchida S., Zhao J., Ozawa K., Nagayama K., Ito S., Takasawa S., Kimura H., Uno M., Yoshizumi M. (2013) Intermittent hypoxia induces the proliferation of rat vascular smooth muscle cell with the increases in epidermal growth factor family and erbB2 receptor. *Experimental Cell Research*, vol. (0), pp.
7. Whelan K.A., Schwab L.P., Karakashev S.V., Franchetti L., Johannes G.J., Seagroves T.N., Reginato M.J. (2013) The Oncogene HER2/neu (ERBB2) Requires the Hypoxia-inducible Factor
8. HIF-1 for Mammary Tumor Growth and Anoikis Resistance. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 288(22), pp. 15865-77.
9. Liang K., Esteva F.J., Albarracin C., Stemke-Hale K., Lu Y., Bianchini G., Yang C.-Y., Li Y., Li X., Chen C.-T., Mills G.B., Hortobagyi G.N., Mendelsohn J., Hung M.-C., Fan Z. (2010) Recombinant Human Erythropoietin Antagonizes Trastuzumab Treatment of Breast Cancer Cells via Jak2-Mediated Src Activation and PTEN Inactivation. *Cancer Cell*, vol. 18(5), pp. 423-35.

11. Li R., Yuan L., Wang J., Wang J. (2011) Co-expression of erythropoietin receptor with human epidermal growth factor 2 may counteract trastuzumab inhibition in gastric cancer. *Medical Hypotheses*, vol. 77(6), pp. 948-52.
12. Zhang C., Duan X., Xu L., Ye J., Zhao J., Liu Y. (2012) Erythropoietin receptor expression and its relationship with trastuzumab response and resistance in HER2-positive breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, vol. 136(3), pp. 739-48.
13. Aguirre M. V., Juaristi J. A., Alvarez M. A., Brandan N. C. Characteristics of in vivo murine erythropoietic response to sodium orthovanadate. *Chemico-Biological Interactions*, 2005, 156:55-68.
14. Stoyanoff TR, Todaro J.S., Aguirre M.V, Brandan N.C. Cell stress,hypoxic response and apoptosis in murine adriamycin-induced nephropathy.J *Pharmacol Toxicol*. 2012, 7: 344-358.

Los resultados obtenidos fueron presentados en las siguientes reuniones científicas:

- 2011- EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ERI-
TROPOYETINA Y DEL ÍNDICE APOPTÓTICO EN EL CARCINOMA
RENAL DE CÉLULAS CLARAS. Stoyanoff T., Espada J., Todaro J.,
Mansur J., Aguirre M., Brandan N. XLIII Reunión anual de la Sociedad
Argentina de Farmacología Experimental. 2 al 4 de Noviembre de 2011.
Tucumán Argentina. ISSN 1853-9858.
- 2011- EVALUACIÓN DEL INDICE DE APOPTOSIS CELULAR EN EL
CARCINOMA RENAL DE CÉLULASCLARAS ¿ESTAMOSANTE UN
MARCADORDE CRECIMIENTO CELULAR? Espada J., Stoyanoff
T., Todaro J., Piazza M., Mansur J., Aguirre M., Brandan N. Congreso
Argentino de Urología 2011. Jornadas Rioplatenses de Urología 2011.
2 al 4 de Noviembre de 2011. Buenos Aires, Argentina.
- 2011- VALORACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ERI-
TROPOYETINA EN EL CARCINOMA RENAL DE CELULAS CLA-
RAS. Espada J., Stoyanoff T., Todaro J., Mansur J., Aguirre M., Brandan
N. Congreso Argentino de Urología 2011. Jornadas Rioplatenses de
Urología 2011. 2 al 4 de Noviembre de 2011. Buenos Aires, Argentina.
- 2012- DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE
ERITROPOYETINA Y DEL ÍNDICE APOPTÓTICO EN EL CARCI-
NOMA RENAL. Stoyanoff T., Espada J., Todaro J., Aguirre M., Brandan

N. XVIII Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste. 27 al 29 de Junio de 2012.

2013- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA ANGIOGÉNESIS EN EL CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS. Aguirre MV., Stoyanoff T., Todaro J., Espada J., Zimmermann MC., Brandan NC. LVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Reunión de la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS) y la XLV Reunión de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE) . Del 20 al 23 de noviembre de 2013. Mar del Plata, Argentina.

2013- EXPRESIÓN ERITROPOYETINA (EPO) Y SU RECEPTOR (EPO-R) EN EL ENTORNO HIPÓXICO DEL CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CLARAS. Todaro J., Aguirre MV., Stoyanoff, T., Espada J., Mansur J., Zimmermann MC., Brandan NC. LVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), Reunión de la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS) y la XLV Reunión de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE) . Del 20 al 23 de noviembre de 2013. Mar del Plata, Argentina.

Dificultades encontradas en la Investigación:

El incremento en los costos de los anticuerpos debido a la inflación ha impedido la adquisición de varios de ellos, como el HIF-2 alfa y otros.

REGULACIÓN DE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE CALCIO

Lucas R. M. Brun

Laboratorio de Biología Ósea. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario.

SÍNTESIS FINAL

La absorción intestinal de calcio (Ca) es, como la de todos los nutrientes esenciales, una función que debe estar perfectamente conservada. La fosfatasa alcalina intestinal (FAi) es una enzima de membrana del enterocito que aún no tiene un rol fisiológico definido. Trabajos previos la relacionan a la absorción de nutrientes, particularmente lípidos y Ca. El objetivo de este trabajo: 1. Investigar la absorción de calcio *in vivo* en ratones *knock out* (KO) del gen *Akp3* que codifica a la FAi duodenal en comparación con ratones *wildtype* (WT). 2. Investigar la relación entre el contenido de Ca dietario y el contenido graso en ratones KO de FAi en comparación con ratones WT. 3. Investigar la captación de Ca en ratones KO de FAi en comparación con ratones WT. Para ello se emplearon ratones C57BL/6 *knock out* (*Akp3*^{-/-}) y *wildtype*. El porcentaje de absorción de Ca *in vivo* se determinó al inicio y luego de recibir dietas conteniendo diferente concentración de Ca (normoCa = 1 g% e hiperCa = 2 g%) durante 24 semanas. Finalizado el experimento se obtuvo el duodeno, el cual fue fijado en OCT y se realizaron cortes de 5 micrómetros con un criostato (Microm 500 OM, Zeiss). Se colorearon con tinción de hematoxilina & eosina para realizar un análisis histopatológico. También se obtuvieron los fémures para estudio de la resistencia ósea en ensayos biomecánicos.

La relación entre la absorción de Ca y la absorción de lípidos se estudio en estos mismos a los cuales se les registró el peso corporal cada 4 semanas. También se determinó calcemia y trigliceridemia. A las 24 semanas se realizó la eutanasia de los animales y se obtuvo el peso de los panículos adiposos perigonadal y retroperitoneal.

La captación de Ca en ratones WT y KO se llevó a cabo empleando la técnica de enterocitos aislados a través de la incorporación de Ca como trazador radiactivo.

El porcentaje de absorción de Ca *in vivo* a las 24 semanas y la captación de Ca no mostraron diferencias entre los grupos. A diferencia de lo esperado en función de trabajos previos tanto la absorción *in vivo* como la captación de Ca en enterocitos aislados no mostró diferencias significativas. Esto podría deberse a que los ratones son KO de una de las isoenzimas de FAi localizada exclusivamente a nivel duodenal, pero no lo son de la isoenzima de FAi que se localiza a lo largo de todo el intestino. La sobreexpresión de ésta última a nivel duodenal podría ser el motivo por el cual no se observó el efecto esperado en este proyecto. Otro motivo podría ser que los experimentos previos fueron llevados a cabo en ratas y ahora en ratones. Se deberá hacer nuevos estudios en ratones para confirmar estos hallazgos.

No se hallaron diferencias en la resistencia ósea entre las diferencias dietas en los ratones WT ni en los ratones KO. Solo se observó una tendencia de incremento en la fuerza de fractura y la energía absorbida a nivel del cuello femoral entre los grupos WT normoCa y KO hiperCa. Se deberá realizar un análisis del contenido de Ca en hueso y Ca en orina para tener datos concretos del balance de Ca y obtener conclusiones al respecto.

En los ratones WT se observó un menor incremento de peso corporal en el grupo alimentado con dieta hiperCa respecto de los alimentados con dieta normoCa. En los ratones KO no se observó diferencia en el incremento de peso en función de la dieta administrada. Se observó menor grasa corporal (perigonadal + retroperitoneal, mg/g peso corporal) en los ratones WT hiperCa respecto a los WT normoCa. Si bien es una tendencia no significativa, dicha disminución no se observó en los ratones KO. El menor incremento de peso corporal debido a la dieta hiperCa en los ratones WT podría deberse a un menor contenido de grasa corporal. Dado que este efecto no se observó en los ratones KO, la FAi participaría en la modificación del peso corporal mediada por el Ca dietario.

Los ratones WT mostraron las características histopatológicas habituales sin diferencias por la diferencia de Ca en la dieta. En los ratones KO normoCa se observaron cambios histopatológicos leves, mientras que el grupo KO hiperCa fue donde se detectaron mayores cambios. Se observó disminución en el número y la altura vellositaria, con ensanchamiento de las mismas. Los quilíferos centrales se presentaron dilatados. Las criptas se observaron atróficas, con disminución franca de su luz. En el estroma se notó disminución de las poblaciones celulares, tanto conectivas como inmunocompetentes.

Dado que en todos los animales KO se detectó atrofia vellositaria y críptica, más evidente en los que recibieron la dieta hiperCa, la FAi ejercería, directa o

indirectamente, algún efecto trófico sobre la mucosa. Dado que las bacterias intestinales estimulan la proliferación celular epitelial-conectiva y linfocitaria, la falta de FAi que contribuye en el mecanismo de defensa contra las bacterias, frenaría la traslocación de productos bacterianos causando la hipotrofia mencionada. También se podría esperar que los hallazgos en los animales KO sean consecuencia del mayor contenido de calcio en el enterocito (de conocido efecto tóxico). La mayor afectación en el grupo KO que recibió dieta hiperCa se explicaría por el efecto tóxico del Ca, efecto que no se observó en el grupo control que recibió la misma dieta hiperCa lo que apoyaría la hipótesis de que la FAi participaría en la regulación de la absorción intestinal de calcio. Sin embargo, dado que no se observaron diferencias en la absorción de Ca ni en la captación del catión, esto no puede ser confirmado.

SUMMARY

Intestinal absorption of calcium (Ca) is essential. Intestinal alkaline phosphatase (IAP) is an enzyme of enterocytes without defined physiological role. Previous work related to the absorption of nutrients, particularly lipids and Ca. The aim of this work was to investigate the role of IAP in Ca absorption. We used knockout mice (Akp3-/-) and wildtype. The percentage of Ca absorption in vivo was determined at baseline and after receiving different diets for 24 weeks: normoCa (1 g%) or hiperCa (2 g%). Once the experiment was performed histopathology analysis to evaluate the duodenum and bone strength was performed in femurs. Body weight was recorded every 4 weeks. We determined serum calcium and triglycerides and weight of the fat pads. Ca uptake was carried out in isolated enterocytes.

The percentage of in vivo Ca absorption and Ca uptake showed no differences between groups. No differences in bone strength were observed between WT groups or KO groups. Only a trend of increase in fracture force and energy absorbed at the femoral neck between normoCa WT and KO groups hiperCa was observed.

In WT hiperCa mice showed a smaller increase in body weight compared with WT normoCa. In KO mice showed no difference in weight gain according to the control diet. Lower body fat was observed in WT hiperCa compared with WT normoCa.

WT mice showed typical histopathologic features without differences by the diet administered. In KO normoCa mice mild histopathological changes

were observed while hiperCa KO group showed decrease in the number and villous height, with widening of the villous, atrophic crypts with reduced light and decrease the cell populations in the stroma.

ROL DE LA INFLAMACIÓN SISTÉMICA EN LA PATOLOGÍA GENERADA POR TUMORES MURINOS

Juan Bruzzo Iraola

IMEX-CONICET, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires

RESUMEN

La asociación entre cáncer e inflamación en un órgano o tejido se encuentra sólidamente establecida. En efecto, se sabe que ciertos tumores, tienen una mayor probabilidad de originarse en sitios de inflamación crónica y que procesos inflamatorios locales pueden acelerar el crecimiento de tumores preexistentes en animales y seres humanos. Por otro lado, la relación entre cáncer e inflamación sistémica no ha sido particularmente estudiada. En este trabajo, demostramos que durante el crecimiento de 4 tumores murinos, de diferente origen, estirpe histológico e inmunogenicidad y de un tumor humano creciendo en ratones nude, se generaron 2 picos temporalmente separados de inflamación sistémica. El primer pico fue relativamente pequeño y transitorio ya que fue detectado durante la primer semana luego de la inoculación del tumor. Tal vez represente, en parte, una respuesta del organismo al trauma mecánico de la inoculación de elementos extraños, ya que la inoculación de fibroblastos murinos normales también produjo una manifestación de inflamación sistémica, aunque menor, que la observada después de la inoculación de células tumorales. Por otro lado, el inicio del segundo pico de inflamación sistémica fue observado cuando el volumen tumoral fue mayor que 500 mm³ y coincidente con el inicio del crecimiento exponencial de cada tumor. Este segundo pico de inflamación sistémica fue significativamente más prominente que el primero y su intensidad aumentó en relación directa con el incremento de la masa tumoral. Estos resultados sugieren que la inflamación sistémica podría ser un fenómeno general de la patología neoplásica y su importancia se puso de manifiesto en el hecho de que, en nuestra colección de tumores, se observó, sorpresivamente, una correlación directa entre la magnitud de la inflamación sistémica generada por cada tumor y su agresividad, correlación que no se observó con la capa-

cidad de generar metástasis. Esto indica, al menos en los tumores analizados por nosotros, que la capacidad de generar una potente respuesta inflamatoria sistémica, produce más efectos deletéreos sobre el organismo que la propia capacidad metastásica, disminuyendo de este modo la sobrevida. En este sentido, se encontró gran infiltración de neutrófilos y alteraciones estructurales en diferentes órganos, que son compatibles con disminución y aún pérdida de función, independiente de la capacidad metastásica de cada tumor. La inflamación sistémica generada por el tumor exacerba el propio crecimiento tumoral estableciendo un circuito de retroalimentación positivo entre ambos. Además, la disminución de las manifestaciones de inflamación sistémica mejoró los efectos anti-tumorales obtenidos con quimioterapia y radioterapia, aunque estos resultados fueron relativamente modestos. Esto se debe a que el tumor cuando supera los 1500 mm³, comienza un crecimiento exponencial, generando un fenómeno de inflamación sistémica progresivo, a pesar de que se continúan administrando las drogas anti-inflamatorias, que hasta ese momento habían sido bastante efectivas para limitar la naciente inflamación sistémica y para retardar el crecimiento tumoral. En cambio, un excelente resultado terapéutico fue alcanzado cuando se realizó el tratamiento anti-inflamatorio junto con la escisión quirúrgica de tumores > 2000 mm³. En este caso, la eliminación quirúrgica de la fuente principal de inflamación sistémica y de posible refractariedad, permitió al tratamiento anti-inflamatorio tener muchas más chances de actuar, contra la inflamación sistémica residual, pero aún deletérea, que perdura al menos 2 semanas después de la extirpación del tumor. Si esta condición inflamatoria sistémica fuera una característica distintiva de muchos cánceres avanzados, un conocimiento más preciso de los mecanismos por los cuales esta inflamación sistémica promueve el crecimiento tumoral y produce múltiples daños en el organismo y la búsqueda de sustancias anti-inflamatorias más efectivas y con menores efectos adversos, serían muy importantes para complementar y mejorar las terapias actuales contra el cáncer.

Palabras clave: cancer, inflamación sistémica, inmunosupresión, caquexia, quimioterapia, radioterapia

ABSTRACT

The link between cancer and inflammation in an organ or tissue has firmly been established on the basis that cancer tends to occur at sites of

chronic inflammation and that local inflammatory processes can accelerate the growth of preexisting tumors in both animals and human beings. In contrast, the relationship between cancer and systemic inflammation has been less studied. In this work, we demonstrated that during the growth of 4 murine tumors of different origin, histological type and immunogenicity and 1 human tumor in nude mice, two temporally separate peaks of systemic inflammation were detected. The first peak was relatively small and transient detected during the first week after tumor inoculation. It probably represented, at least in part, the response of the organism to the mechanical trauma of inoculation of foreign bodies, because the inoculation of normal fibroblasts produced a rather similar manifestation of systemic inflammation than that observed after the inoculation of tumor cells. On the other hand, the onset of the second peak was observed when the tumor was 500 mm³, coincidental with the beginning of the exponential tumor growth. This second peak of systemic inflammation was significantly more prominent than the first one and its magnitude increased progressively in parallel with the increase of tumor mass. These results suggest that systemic inflammation could be a general phenomenon of neoplastic pathology and its importance became manifest in the fact, that in our tumor collection, was observed, surprisingly, a direct correlation between the magnitude of systemic inflammation generated by each tumor and its aggressiveness. On the other hand tumor aggressiveness did not correlate to the tumor's ability to disseminate or metastasize, suggesting that the magnitude of systemic inflammation rather than the metastatic ability produce more deleterious effects in the organism, diminishing survival. In fact, was observed a large number of PMN and damage in tissues and organs, that are compatible with impair function, independently of tumor's metastatic ability. The systemic inflammation generated by tumor enhance tumor growth, establishing a positive feedback between both. In addition, the attenuation of the manifestations of systemic inflammation improves the anti-tumor effects obtained with radiotherapy and chemotherapy. However, this results were relatively modest. This is probably due to the fact that when tumor surpass 1500 mm³, begins an exponential growth, generating a systemic inflammation which magnitude increase progressively, even though the continue inoculation of the anti-inflammatory drugs. Instead, an excellent therapeutic result was obtained when the anti-inflammatory treatment schedule was combined with surgery. In this case, the surgery eliminated the main source of systemic inflammation and in consequence an anti-inflammatory treatment had a better chance to act against the residual, but still deleterious, systemic inflamma-

tion. If a systemic inflammatory condition were a hallmark of many advanced cancers, a more accurate knowledge of the underlying mechanisms by which systemic inflammation promotes tumor growth and produces multiple deleterious effects on the organism and the search for new more effective and with lesser side effects anti-inflammatory factors will help to design new strategies to complement and to improve the current therapies against cancer.

Key words: cancer, systemic inflammation, immunosuppression, cachexia, chemotherapy, radiotherapy

ROL DE LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS EN MODELOS TUMORALES Y NO TUMORALES DE MAMA HUMANA

Ariana Bruzzzone, Lucía Gargiulo, Ezequiel Rivero, Sabrina Copsel, Carlos Davio e Isabel Luthy

Laboratorio de Hormonas y Cáncer, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es el más frecuente entre las mujeres y el segundo tipo de cáncer más común considerando ambos sexos .

Durante una situación de estrés, el sistema nervioso induce la liberación de las catecolaminas endógenas, epinefrina y la norepinefrina . Niveles plasmáticos aumentados de las catecolaminas tienen consecuencias fisiológicas, sin embargo exposiciones prolongadas a las mismas provocan consecuencias deletéreas en la salud .

Con respecto al estrés, se han asociado factores psicológicos con la sobreexpresión de genes involucrados en la tumorigénesis en humanos . Después de situaciones estresantes el riesgo de cáncer de mama aumenta al doble . Las catecolaminas tienen un severo impacto en las vías involucradas en la progresión tumoral por un efecto directo sobre el tumor o sobre el microambiente tumoral como por un efecto indirecto a través del sistema inmune .

Las catecolaminas median sus funciones a través de receptores adrenérgicos (RA) distribuidos en la mayoría de los tejidos. La familia de los α -RA señalan vía G_i/o , inhibiendo la adenilil ciclase y disminuyendo los niveles de AMP cíclico (AMPC). Los β -RA activan la subunidad Gas, estimulando la adenilil ciclase y aumentando estos niveles de AMPC. El subtipo β -RA puede activar a Gs en ausencia de agonista, particularmente cuando el receptor se expresa en altos niveles generando una activación basal del receptor.

La señalización de AMPC está finamente regulada a distintos niveles asegurando la finalización de las señales iniciadas. Entre ellas se encuentran: la degradación del AMPC por enzimas que lo hidrolizan , la liberación de AMPC al espacio extracelular y la desensibilización del receptor.

La presencia de RA en mama y en tumores de mama puede ser importante para la regulación de la proliferación celular y para la evolución de esta

enfermedad ante situaciones de estrés. Trabajos previos han demostrado la expresión de α - y β -RA funcionales en células tumorales y no tumorales de mama humana . La estimulación α -RA provoca un aumento de la proliferación celular in vitro y del crecimiento tumoral in vivo , mientras que la estimulación β -RA provoca una disminución en la proliferación celular y tumoral , cambios en la morfología e inducción de la apoptosis .

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Trabajos previos muestran que las células tumorales y no tumorales expresan α y β -RA. Evidencias sugieren una respuesta diferencial frente a la epinefrina entre dichas células. En base a esto, planteamos que existe una diferencia en la relación de α y β -RA entre las líneas tumorales y no tumorales de mama, y que el desbalance entre los mismos modifica el comportamiento celular.

OBJETIVOS

- Estudiar el efecto de la epinefrina sobre la proliferación, adhesión y migración en líneas no tumorales de mama humana y compararlo con líneas tumorales.
- Determinar la cantidad de β -RA en ambos modelos celulares.
- Analizar si la desregulación de la expresión del β -RA es capaz de modificar estos parámetros.

METODOLOGÍA

Líneas celulares

Se utilizaron las líneas MCF10-A y HBL-100 (no tumorales de mama humana) y MCF-7 y MDA-MB-231 como tumorales. Las células se cultivaron como se describe en .

Proliferación celular

Se evaluó por ensayos de incorporación de [3H]-Timidina y por ensayos de recuento celular utilizando cámara de Neubauer como se describe en .

Ensayos de adhesión

Las células se sembraron en placas de 12 celdas durante 24 hs a una concentración de $1,5 \times 10^5$ células/celda y la adhesión se midió como se describe en .

Ensayos de migración

La migración se evaluó mediante ensayos con insertos de 8 μ M de diámetro. Se sembraron 2×10^4 células sobre la membrana porosa, y se las dejó adherir 4 hs. Luego, se aspiró el medio y se lo cambió por medio base con el compuesto adrenérgico a estudiar durante 16 hs. Se trataron las células con cristal violeta 0,05% en metanol durante 10 minutos. Se contaron las células que migraron utilizando un microscopio invertido.

Binding

La cuantificación de β -RA se evaluó mediante ensayos de binding como se describe en utilizando [3H]-CGP12177 y compitiendo con Isoproterenol 100nM, a 4 °C en células enteras.

Silenciamiento y sobreexpresión de receptores

Se utilizaron siRNAs descritos previamente por . La concentración fue 0,8 nM (para las MCF-7) y 0,4 nM (para las MCF-10A) de siRNA β 2-RA o siRNA irrelevante como control (scrambled). Para sobreexpresar el β 2-RA se utilizó un plásmido que se detalla en . Los experimentos se realizaron 72 hs post-tranfección.

Medición de AMPc

Se sembraron $1,7 \times 10^4$ células/celda en placas de 24 celdas y la medición se realizó como se describe en .

Estadística

Los experimentos realizados se repitieron al menos dos veces con resultados idénticos. Se utilizaron el test t Student ó ANOVA- Dunnet o Bonferroni .

RESULTADOS

Proliferación celular

En las líneas no tumorales, la epinefrina (Epi) 1 nM y 1 μ M causó una disminución significativa de la proliferación celular, en cambio en las líneas tumorales, la Epi produjo un aumento de la misma (Fig.1). Los niveles μ M de Epinefrina se generan frente a un estado de estrés agudo (26) y la concentración 1 nM para simular los niveles en un estado basal.

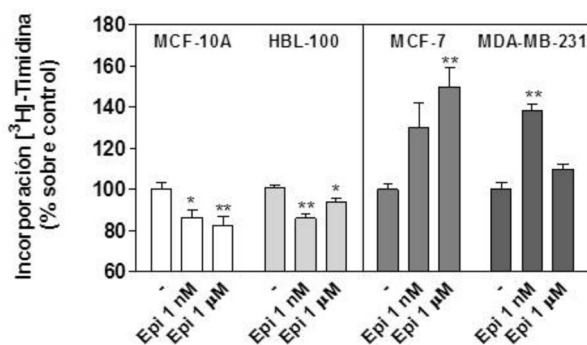


*Figura 1. Efecto de la epinefrina (Epi) a distintas concentraciones (1 nM y 1 μ M) sobre la proliferación celular medida por incorporación de [^{3} H]-Timidina para las líneas MCF-10A, HBL-100, MCF-7 y MDA-MB-231. Los valores se expresan como porcentaje con respecto al control. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ por ANOVA seguido de test de Dunnett.*

Para determinar el efecto de la estimulación β -adrenérgica se incubaron con el agonista β -adrenérgico isoproterenol 1 μ M (Iso). En todas las líneas, el Iso provocó una disminución de la proliferación celular (Fig.2). En el caso de la línea MCF-10A, la disminución de la proliferación inducida por Iso o Epi, se correlaciona con una disminución de la fosforilación de ERK1/2 (datos publicados en).

Adhesión

Se evaluó el efecto de la Epi, del agonista específico α -adrenérgico dexmedetomidina (Dex) 1 μ M y del Iso 1 μ M sobre la adhesión celular (Fig.3). En las líneas no tumorales, la Epi y el Iso causaron un aumento altamente significativo en la adhesión celular. La Dex no tuvo efecto. Para las líneas tumorales,

rales, el Iso indujo un aumento en la adhesión celular, mientras que la Epi no tuvo efecto. En la línea MDA-MB-23, la Dex disminuyó la adhesión celular.

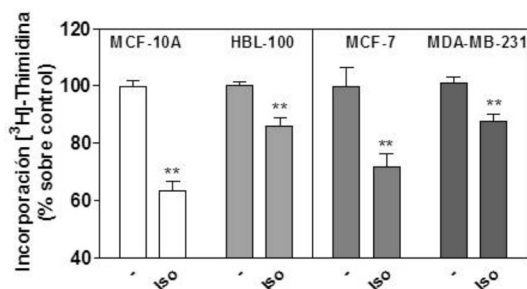


*Figura 2. Efecto del agonista β -adrenérgico Isoproterenol (Iso) $1 \mu\text{M}$ sobre la proliferación celular medida por incorporación de $[^3\text{H}]$ -Timidina para las líneas MCF-10A, HBL-100, MCF-7 y MDA-MB-231. Los valores se expresan como porcentaje con respecto al control. ** $p < 0,01$ por test t Student.*

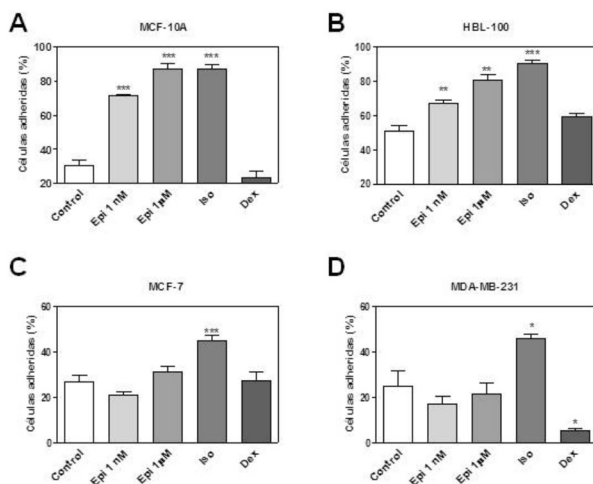


*Figura 3. Efecto de la epinefrina (Epi), del agonista α_2 -adrenérgico dexmedetomidina (Dex) $1 \mu\text{M}$ y del agonista β -adrenérgico isoproterenol (Iso) $1 \mu\text{M}$ sobre la adhesión celular. Los resultados se expresan como porcentaje de células adheridas luego de los respectivos tratamientos en la línea MCF-10A (panel A), HBL-100 (panel B), MCF-7 (panel C) y MDA-MB-231 (panel D). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ por ANOVA seguido de test de Dunnett.*

Migración

Para la línea MCF-10A, la Epi 1 μ M y el Iso disminuyeron la migración celular (Fig.4). En cambio, para la línea MCF-7, la Epi 1 nM aumentó la migración, el Iso la disminuyó, mientras que la Dex provocó un aumento de la misma.

En la línea HBL-100 si bien no se encontraron diferencias significativas, la Epi mostró una tendencia semejante a la encontrada en la línea MCF-10A. El Iso disminuyó la migración. Para la línea MDA-MB-231, solo la Dex 1 μ M logró aumentarla.

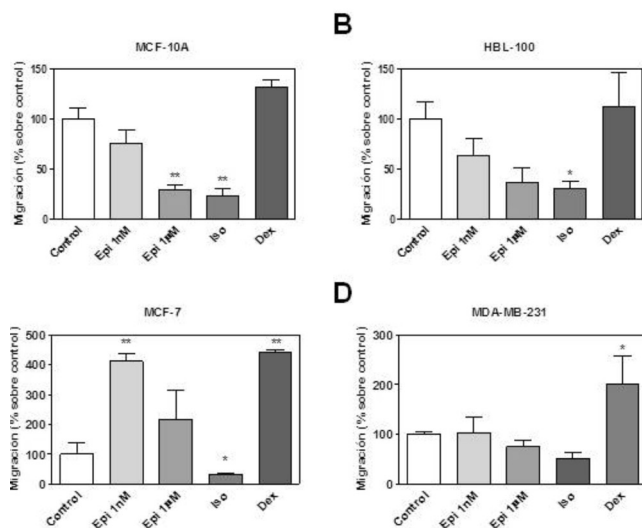


*Figura 4. Efecto de la epinefrina (Epi), del agonista α_2 -adrenérgico dexmedetomidina (Dex) 1 μ M y del agonista β -adrenérgico isoproterenol (Iso) 1 μ M sobre la migración celular de la línea MCF-10A (panel A), HBL-100 (panel B), MCF-7 (panel C) y MDA-MB-231 (panel D). Los resultados se expresan en porcentaje con respecto al control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ con respecto al control por ANOVA seguido de test de Dunnett.*

Cuantificación de receptores β adrenérgicos

En la siguiente tabla se muestran el número de sitios de unión β -adrenérgicos por célula para ambas líneas y los sitios α -RA extraídos de un trabajo previo. Se calculó la relación de sitios β/α_2 . La proporción de β -RA/ α -RA es alta para las células MCF-10A, mientras que las células MCF-7 expresan mayor cantidad de α -RA que de β -RA.

Sitios de unión/célula	MCF-10A	MCF-7
β	132.000 $\pm$ 21.000	80.500 $\pm$ 5.500
α_2	19.300 $\pm$ 3.500	103.062 $\pm$ 23.700
Relación β / α_2	6,84	0,78

Cinética de producción de AMPc

Las líneas no tumorales producen un pico máximo de AMPc intracelular en ausencia de MIX a los 2,5 minutos (Fig5). Las MCF-7 muestra una producción mucho menor, mientras que los niveles de la línea MDA-MB-231 no son detectables. En todos los casos, los niveles observados de AMPc extracelular son bajos, salvo para la línea MCF-10A, lo que podría explicarse por la alta producción de AMPc. El contenido total de AMPc es mucho mayor, para las líneas no tumorales que para las tumorales (Fig.6).

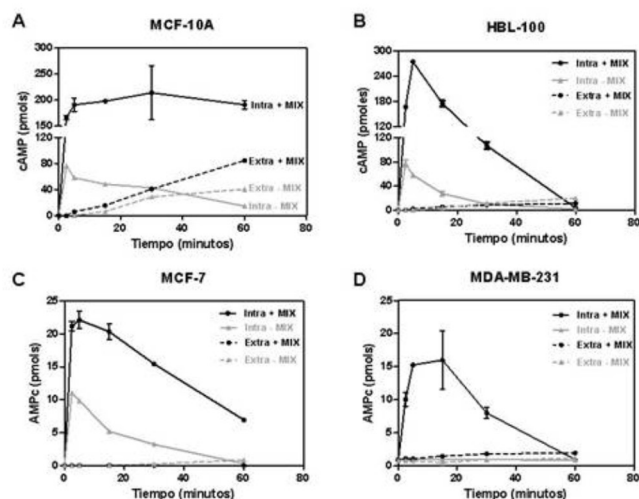


Figura 5. Cinética de producción de AMPc intra y extracelular en presencia o ausencia de 3-isobutil-metil-xantina (MIX) para las líneas MCF-10A (panel A), HBL-100 (panel B), MCF-7 (panel C) y MDA-MB-231 (panel D) estimuladas con isoproterenol 1 μ M. Los valores corresponden a pmoles de AMPc producidos por $1,7 \times 10^5$ células

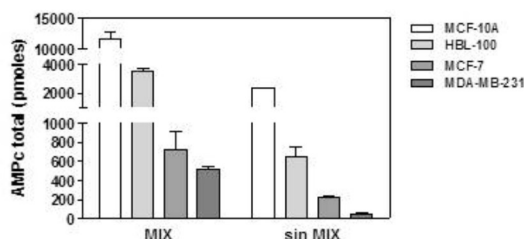


Figura 6. Cuantificación total del AMPc intracelular para las diferentes líneas en presencia o ausencia del isobutil-metil-xantina (MIX). Los valores se obtuvieron mediante el cálculo del área bajo la curva de la cinética de producción de AMPc por estimulación con isoproterenol $1 \mu\text{M}$ para cada línea.

Desensibilización del receptor

La producción de AMPc depende de la cantidad de receptores que desencadenan la respuesta y la velocidad a la cual éstos se desensibilizan, disminuyendo así la señal. Por este motivo, decidimos evaluar si la diferencia en la cantidad de AMPc observada entre las células MCF-10A y MCF-7 se debía a una diferencia en la velocidad de desensibilización del receptor. Se incubaron las células diferentes tiempos con Iso en ausencia de MIX, se lavaron y se re-estimularon con Iso 10 minutos en presencia de MIX. Se evaluó la capacidad del receptor de producir nuevamente AMPc. En la Fig.7 se observan las curvas de producción de AMPc total, de las cuales se estimó la vida media del receptor, la cual no difiere significativamente entre ambas líneas.

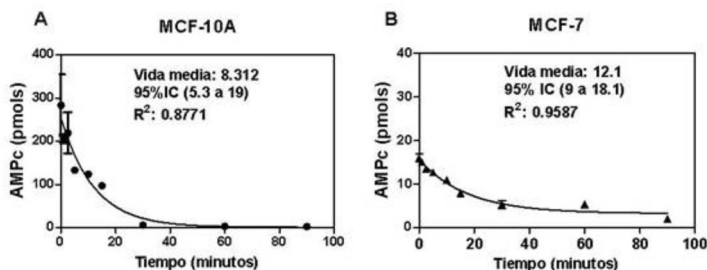


Figura 7. Producción de AMPc total por isoproterenol $1 \mu\text{M}$ en células previamente estimuladas durante los tiempos indicados. Los valores se expresan como pmoles de AMPc por $1,7 \times 10^6$ células MCF-10A (panel A) y MCF-7 (panel B). Cinética de producción de AMPc con el agonista endógeno Epinefrina

Se realizó una curva concentración respuesta para epinefrina, en una situación que se asemeja a lo que ocurre durante el estrés. En células MCF-10A, la Epi produjo un aumento concentración-respuesta del AMPc (Fig.8). En cambio, en estas mismas condiciones, los valores de AMPc no se modificaron para la línea MCF-7.

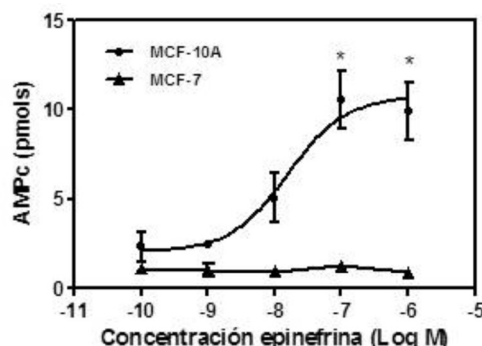


*Figura 8. Curva de producción de AMPc a concentraciones crecientes de epinefrina para las líneas MCF-10A y MCF-7. Los valores se expresan como pmoles de AMPc por $1,7 \times 10^6$ células. * $p < 0,05$ por ANOVA seguido de test de Dunnet.*

Modulación de la expresión del β -RA y su efecto en proliferación, adhesión y migración

En la mama el subtipo principalmente expresado es el subtipo β -RA. Por este motivo decidimos modular la expresión de este subtipo, sobreexpresándolo o silenciándolo, con el fin de evaluar dicho efecto sobre el comportamiento de la célula. Se corroboró esta técnica por *binding* para cada condición (Fig.9).

La incorporación del siRNA β -RA, causó un aumento significativo de la proliferación una disminución de la adhesión y un aumento en la migración celular (Figura 10). En cambio, la sobreexpresión del β -RA disminuye la proliferación, aumenta la adhesión y disminuye la migración.

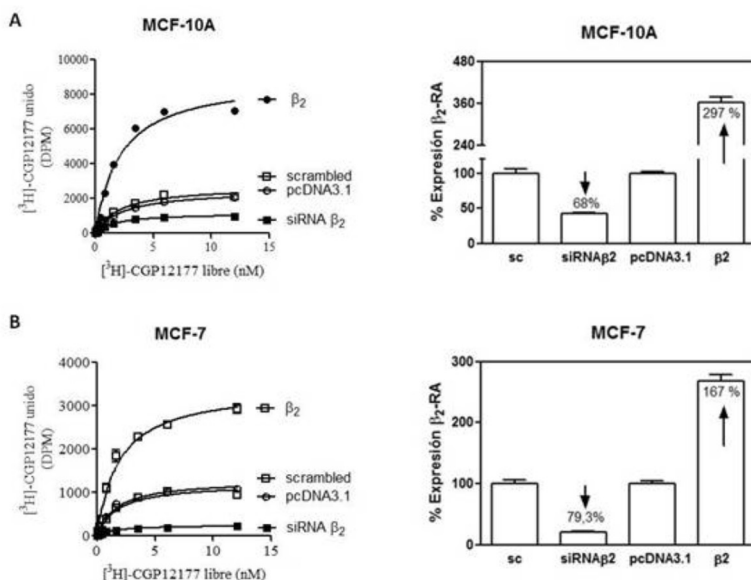


Figura 9. Cuantificación de sitios β -adrenérgicos mediante el ensayo de binding en las líneas MCF-10A (panel A) y las MCF-7 (panel B) transfectadas con la secuencia scrambled (sc), siRNA β_2 pcDNA3.1 y el plásmido codificante para el β_2 -RA. A la izquierda se muestran las curvas de saturación para cada condición. A la derecha la cuantificación de los sitios β -RA expresada como porcentaje con respecto al sc y al pcDNA3.1 respectivamente.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

La respuesta a la epinefrina difirió notablemente entre las líneas tumorales y no tumorales. La línea MCF-10A, posee más β -RA que α_2 -RA. Este hecho podría explicar la respuesta diferencial entre ambas líneas a la epinefrina, ligando capaz de unirse a ambos receptores con la misma afinidad.

Esto se corroboró con el uso de agonistas específicos para cada tipo de receptor. El efecto proliferativo de los agonistas α y el aumento en la migración causado por el agonista Dexmedetomidina en ambos modelos tumorales concuerdan con el efecto de la Epi en este modelo, donde el balance β/α está inclinado hacia la respuesta α -adrenérgica.

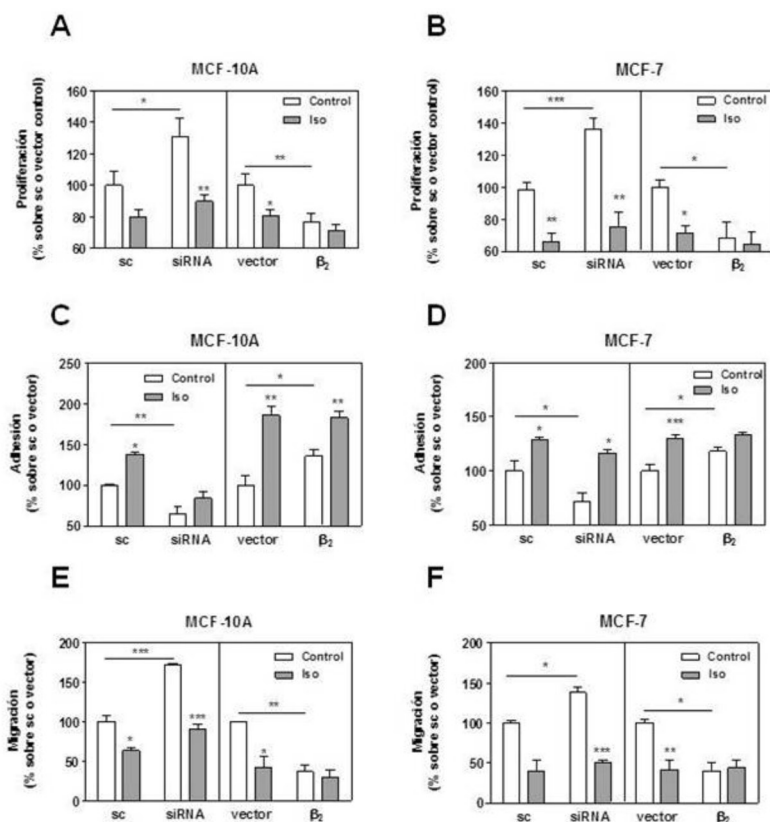


*Figura 10. Efecto del silenciamiento y la sobreexpresión del β_2 -RA sobre la proliferación (paneles A y B), la adhesión (paneles C y D) y migración celular (E y F) de células MCF10-A y MCF-7 estimuladas o no con isoproterenol 1μ M en las líneas transfectadas con sc, siRNA β_2 pcDNA3.1 (vector) y el plásmido codificante para el β_2 -RA. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ por ANOVA seguido de test de Bonferroni.*

Asimismo, los agonistas β -adrenérgicos causan el mismo efecto en cuanto a proliferación, adhesión y migración que la Epi en los modelos no tumorales, nuevamente sosteniendo que el balance β/α en estos modelos se inclina hacia el β .

La incorporación del siRNA- β -RA, permitió imitar una situación más cercana al caso de la línea MCF-7, donde hay más sitios α que β -adrenérgicos. El silenciamiento del β -RA en ambas líneas causó un aumento significativo de la proliferación y migración, y una disminución de la adhesión. Por otro

lado, la sobre-expresión del β -RA, permitió imitar una situación más cercana al caso de la línea MCF-10A, incrementando la adhesión y disminuyendo la proliferación y migración celular. Esto demuestra la importancia del β -RA en estos procesos.

En la transición hacia la malignidad, la célula podría estar modificando la relación de los RA y de esta forma, regulando su comportamiento. En coincidencia con esto, en tumores de mama de rata, la expresión del β 2-RA es inversamente proporcional al crecimiento tumoral. Estudios con muestras humanas demuestran que los tumores más agresivos y con peor pronóstico presentan una alta expresión de α -RA, mientras que los β -RA se expresan principalmente en tumores más benignos y con mejor pronóstico. Resulta interesante en el futuro, evaluar cómo ocurre esta desregulación de la expresión de los RA entre mama normal y tumoral.

ABSTRACT

Breast cancer is the most frequent malignancy in women worldwide. The α - and β -adrenergic receptor (AR) pathways have been implicated in cancer progression.

The goal of the present investigation was to compare Epinephrine response on cell proliferation, adhesion and migration in non-tumor and tumor human breast cell lines, and to determine the β -AR role on these effects. Epinephrine caused an inhibition of cell proliferation in the non-tumor cells, whereas it increased cell proliferation in the cancer cells. Isoproterenol (β -AR agonist), decreased this parameter in all cell lines.

In non-tumor breast cells, Epinephrine and isoproterenol increased cell adhesion and decreased cell migration. In tumor cells, isoproterenol also increased cell adhesion and decreased cell migration whereas Epinephrine did not modify cell adhesion, but increased cell migration.

MCF-10A cells showed a greater proportion of β -AR over α -AR, while the proportion is opposite MCF-7 cells. According to it, non-tumor cells produced more cAMP that tumor cells do.

The inhibition of β -AR expression caused a significant enhancement of cell proliferation and migration, and a diminution of cell adhesion. Instead, β -AR over-expression induced a diminution of cell-proliferation and migration, and an increase of cell adhesion.

REFERENCIAS

1. Ferlay *et al.*, Int.J.Cancer,(2010).
2. Armaiz-Pena *et al.*, Brain Behav Immun 23,10(2009).
3. Antoni *et al.*, Nat.Rev.Cancer 6,240(2006).
4. Lutgendorf *et al.*, J Clin Oncol 28,4094(2010).
5. Lillberg *et al.*, Am.J Epidemiol. 157,415(2003).
6. Barron *et al.*, Ther.Adv.Med.Oncol. 4,113(2012).
7. Thaker *et al.*, Cell Cycle 6,430(2007).
8. Chidiac *et al.*, Mol.Pharmacol. 45,490(1994).
9. Houslay, Semin Cell Dev Biol 9,161(1998).
10. Wielinga *et al.*, J Biol Chem 278,17664(2003).
11. Vandewalle *et al.*, J Cancer Res.Clin.Oncol. 116,303(1990).
12. Wellner *et al.*, B. J. Baum, Biochem.Pharmacol. 37,3035(1988).
13. Vazquez *et al.*, Cancer Chemother.Pharmacol 58,50(2006).
14. Bruzzone *et al.*, Br.J.Pharmacol.,(2008).
15. Bruzzone *et al.*, Current Cancer Drug Targets,(2011).
16. Carie, Sebt, Oncogene 26,3777(2007).
17. Campbell *et al.*, PLoS.Biol. 10, e1001363(2012).
18. Slotkin *et al.*, Breast Cancer Res.Treat. 60,153(2000).
19. Lamb, Steinberg, J.Cell Physiol 192,216(2002).
20. Boe, *et al.*, Br.J.Cancer 72,1151(1995).
21. Bruzzone *et al.*, FASEB J,(2013).
22. Tubio *et al.*, Journal of Biological Chemistry 285,14990(2010).
23. Landen *et al.*, Cancer Res 67,10389(2007).
24. Davio *et al.*, Biochem Pharmacol 50,91(1995).
25. Dowdy, Wearden, Statistics for research (John Wiley & Sons, Inc, New York, 1983).
26. Cole, Sood, Clin Cancer Res 18,1201(2012).
27. Inderwies, *et al.*, Domest.Anim Endocrinol. 24,123(2003).
28. Marchetti *et al.*, Endocrinology 126,565(1990).
29. Xhaard, *et al.*, J Med Chem 49,1706(2006).
30. Vazquez, *et al.*, Breast Cancer Res.Treat. 55,41(1999).
31. Marchetti, *et al.*, J.Steroid Biochem.Mol.Biol. 38,307(1991).
32. Powe *et al.*, Breast Cancer Res.Treat. 130,457(2011).

BÚSQUEDA DE PRINCIPIOS ACTIVOS INHIBIDORES DE BOMBAS DE RESISTENCIA A MULTIDROGAS (MDR) A PARTIR DE PLANTAS NATIVAS DEL CENTRO DE ARGENTINA UTILIZANDO UN MODELO DE CÉLULAS LINFOBLÁSTICAS DE LEUCEMIA AGUDA CON SOBRE-EXPRESIÓN DE P-GLICOPROTEINA (P-GP).

Dra. María Cecilia Carpinella.

Laboratorio de Química Fina y Productos Naturales, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba. Avda. Armada Argentina 3555 (5000) Córdoba, Argentina.

La importancia de bloquear la expulsión de citotóxicos ejercida por la bomba de resistencia a multidrogas (MDR) P-glicoproteína (P-gp), radica en el rol preponderante que este efecto desempeña en el desarrollo del fenotipo resistente que adquieren las células tumorales tras ser sometidas a tratamientos quimioterápicos (Su et al., 2012). Este hecho se debe a la capacidad de esta proteína de trans-membrana de mediar el eflujo de una gran variedad de citotóxicos no relacionados estructural ni funcionalmente entre sí, impidiendo que estos alcancen las concentraciones intracelulares necesarias para obtener el efecto deseado. Este fenómeno farmacológico, constituye una de las principales causas de fracaso terapéutico en la lucha contra el cáncer (Su et al., 2012). La importancia de bloquear la extrusión de drogas antitumorales ejercida por P-gp no sólo se limita a obtener un aumento de la eficacia de las mismas, sino también a impedir el efecto anti-apoptótico ejercido por la bomba, debido a su acción inhibidora de la activación de caspasas (Miao and Ding, 2003). Esto subraya la relevancia de diseñar estrategias racionales para su inhibición.

Actualmente la industria farmacéutica cuenta con algunas sustancias con estas características, sin embargo la mayoría de estos moduladores presentan efectos no deseados tales como toxicidad o influencia negativa en la farmacocinética de la droga anti-cancerígena. En relación a lo expresado, nuevas herramientas químicas que inhiban la expulsión de anticancerígenos sustrato de P-gp deben ser estudiadas y establecidas.

Las plantas constituyen una excelente fuente de compuestos bioactivos, los cuales pueden actuar como agentes capaces de revertir la resistencia mediada por la glicoproteína. Entre las posibles especies a ser estu-

diadas se encuentran aquellas pertenecientes a nuestra flora, las cuales no han sido aún exploradas. Trabajos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio permitieron el aislamiento de 18 compuestos con diferentes bioactividades a partir de plantas nativas y naturalizadas del centro de Argentina. Los metabolitos obtenidos fueron: 23-metil-6-O-desmetilauricepirona (**1**), quercetina (**2**) y 3-O-metilquercetina (**3**) (Joray et al., 2013) aislados como antibacterianos a partir de *Achyrocline satureioides*. Demostrando la misma propiedad se obtuvieron, a partir de *Flourensia oolepis*, pinocembrina (**4**) (Diaz Napal et al., 2009), isoliquiritigenin (**5**), 2',4'-dihidroxichalcona (**6**), 7-hidroxiflavanona (**7**) y 7,4'-dihidroxi-3'-metoxiflavanona (**8**) y de *Lithrea molleoides* (Z,Z)-5-(trideca-4, 7-dienil)-resorcinol (**9**) (Carpinella et al., 2011; Joray et al., 2011). Como inhibidor de tirosinasa, se obtuvo, a partir de *Dalea elegans* a 5,2',4'-trihidroxi-2'',2''-dimetilcromeno-(6,7:5'',6'')-flavanona, el cual fue llamado dalenin (**10**) (Chiari et al., 2011). Cuatro compuestos con actividad antifúngica fueron obtenidos de *Melia azedarach*, a saber: escopoletin (**11**), vainillina (**12**), 3-metoxi 4-hidroxicinamaldehído (**13**) y (±) pinorresinol (**14**) (Carpinella et al., 2005; Carpinella et al., 2003). A partir de este árbol se aisló el tetranortriterpeno meliartenin (**15**) (Carpinella et al., 2002). De *Baccharis salicifolia* se obtuvo apigenin (**16**), mientras que ilicol (**17**) fue aislado de *F. oolepis*, ambos inhibidores de la germinación y del desarrollo de *Raphanus sativus* y *Panicum miliaceum* (del Corral et al., 2012). También se evaluó naringenina (**18**) debido a su estructura química relacionada.

En primer lugar, se debieron determinar las máximas dosis no citotóxicas (máximas dosis a las cuales se observa una citotoxicidad igual o menor al 20%) de cada uno de estos compuestos con el fin de ser utilizadas en los estudios posteriores destinados a medir el efecto anti-P-gp (Joray et al., 2012). Como límite superior de concentración a evaluar se establecieron 40 mg/mL. Los ensayos de citotoxicidad fueron realizados mediante la técnica de MTT (Joray et al., 2011) en células K-562 obtenidas de una leucemia mieloide crónica. Su derivada por sobre-expresión de P-gp, las células Lucena-1, fueron conseguidas tras el tratamiento prolongado con doxorubicina (DOX). Por otro lado se utilizaron células CCRF-CEM, provenientes de una leucemia linfoblástica aguda cuya contraparte resistente (CEM / ADR5000) se logró con la adición sostenida del mencionado quimioterápico al medio de cultivo. El porcentaje y la selectividad de sobre-expresión de la bomba, fue confirmado por citometría de flujo. En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 1. Máxima concentración a la cual los compuestos 1-18 presentan una citotoxicidad $\leq$ a 20%.

Concentración con citotoxicidad $\leq$ a 20% (mg/ml)	Compuesto	
	CCRF-CEM/ CEM/ADR5000	K562 / Lucena 1
40	escopoletin vainillina	escopoletin vainillina 7-hidroxi flavanona ilicol naringenina ($\pm$)pinorresinol
20	apigenina ilicol 23-metil-6-O-desmetilauricepirona naringenina	apigenina 7,4'-dihidroxi-3'-metoxiflavanona 23-metil-6-O-desmetilauricepirona pinocembrina
10	dalenin ($\pm$)pinorresinol quercetina (Z,Z)-5-(trideca-4,7-dienil)-resorcinol	dalenin 4-hidroxi-3-metoxicinamaldehído isoliquiritigenina (Z,Z)-5-(trideca-4,7-dienil)-resorcinol
5	7-hidroxi flavanona isoliquiritigenina pinocembrina	quercetina
2.5	7,4'-dihidroxi-3'-metoxiflavanona 4-hidroxi-3-metoxicinamaldehído 3-O-metilquercetina	2',4'-dihidroxichalcona 3-O-metilquercetina
1.25	2',4'-dihidroxichalcona	
0.3	meliartenin	meliartenin

Luego de poner a punto la técnica de MTT modificada para poder determinar la actividad bloqueante de la expulsión de DOX en células Lucena 1, evaluadas en primera instancia, se estudió la capacidad de cada compuesto para ejercer el mencionado efecto. Este ensayo se realizó también sobre las células salvajes K562 con el objetivo de comprobar si el incremento en la actividad de DOX se debía a una reversión de la resistencia que permitía su ingreso al interior de la célula y no a un fenómeno de sinergismo entre el compuesto y el antineoplásico.

A partir de los resultados obtenidos, ($\pm$) pinorresinol resultó ser el más efectivo, disminuyendo hasta 30 veces la resistencia de las células a una concentración de 40 μ g/mL. Concentraciones superiores (60 y 80 μ g/mL) fueron también evaluadas debido a que demostraron ser no citotóxicas (Fig. 1). Los resultados obtenidos mostraron que las mismas no provocaron una

disminución en el IR significativamente superior a la observada con 40 $\mu\text{g/mL}$ (33 y 32 veces, respectivamente).

El conocido inhibidor de P-gp verapamilo, logró disminuir el IR 31.8 veces a 15 $\mu\text{g/mL}$ (30.5 μM), mientras que ($\pm$) pinorresinol a una concentración similar, 10 $\mu\text{g/mL}$ (27.9 μM), logró disminuirlo 25.3 veces. Esto demuestra el nivel de eficacia del compuesto aislado. El compuesto 23-metil-6-O-desmetilauricepirona (20 $\mu\text{g/mL}$), de *Achyrocline satureioides*, demostró ser también efectivo aunque con menor potencia que el lignano.

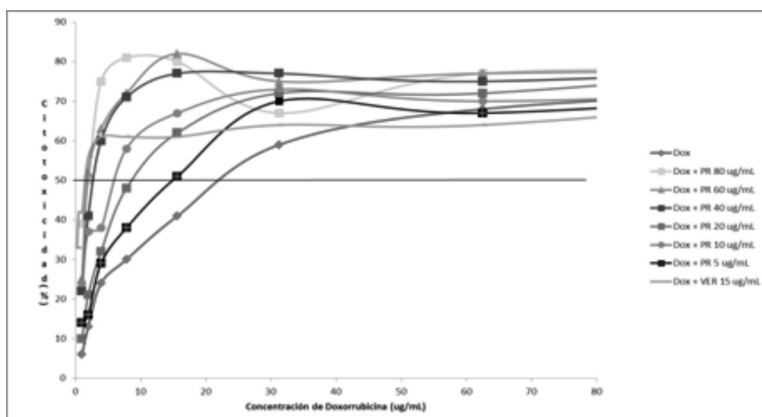


Figura 1. Curvas de citotoxicidad de DOX en Lucena 1 en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de ($\pm$) pinorresinol (5-80 $\mu\text{g/mL}$) determinada por MTT. Se utilizó verapamilo como control positivo. DOX= doxorubicina, PR= ($\pm$) pinorresinol, VER= verapamilo.

Con el fin de evaluar el mecanismo por el cual ($\pm$) pinorresinol ejerce el bloqueo de la extrusión de DOX, se realizaron ensayos de modelado molecular (docking standard) utilizando un modelo de homología basado en P-gp de ratón embebida en una bicapa lipídica. Los resultados obtenidos indicaron que ($\pm$) pinorresinol actuó a través del bloqueo de la función de la glicoproteína, uniéndose a una serie de residuos aromáticos involucrando el vértice de la "V" invertida que forman las alfa-hélices trans-membrana 4, 5 y 6 (Fig. 2). Las energías libres de unión estimadas para estos compuestos indicarían un nivel de efectividad similar a verapamilo (inhibidor de primera generación) pero menor que tariquidar (inhibidor de tercera generación, uno de los más potentes ensayados *in vitro*), utilizados como modelos (Tabla 2).

tors of the glycoprotein. Plants, mainly those of our native flora, constitute an excellent source of bioactive compounds, which may act as reversal agents for the resistance mediated by P-gp, thus restoring the cytotoxicity of chemotherapies.

After the evaluation of 18 compounds with different bioactivities obtained in our laboratory from native and naturalized plants from central Argentina, the lignan ($\pm$) pinoresinol showed to be highly effective in reversing the expulsion of the chemotherapeutic doxorubicin mediated by P-gp in resistant K562 cells. This compound showed a reduction of the Resistance Index (IR) of these cells up to 30 times at 40 mg/ml. Standard modeling studies (molecular docking) showed that the compound affects the functionality of the pump, binding to aromatic residues involved in the apex of the inverted "V" formed by the trans-membrane α -helices 4, 5 and 6.

REFERENCIAS

1. Carpinella, C., Ferrayoli, C., Valladares, G., Defago, M., Palacios, S., 2002. Potent Limonoid Insect Antifeedant from *Melia azedarach*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 66, 1731-1736.
2. Carpinella, M.C., De Bellis, L., Joray, M.B., Sosa, V., Zunino, P.M., Palacios, S.M., 2011. Inhibition of development, swarming differentiation and virulence factors in *Proteus mirabilis* by an extract of *Lithrea molleoides* and its active principle (Z,Z)-5-(trideca-4',7'-dienyl)-resorcinol. *Phyto-medicine* 18, 994-997.
3. Carpinella, M.C., Ferrayoli, C.G., Palacios, S.M., 2005. Antifungal Synergistic Effect of Scopoletin, a Hydroxycoumarin Isolated from *Melia azedarach* L. Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 2922-2927.
4. Carpinella, M.C., Giorda, L.M., Ferrayoli, C.G., Palacios, S.M., 2003. Antifungal Effects of Different Organic Extracts from *Melia azedarach* L. on Phytopathogenic Fungi and Their Isolated Active Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 2506-2511.
5. Chiari, M.E., Vera, D.M.A., Palacios, S.M., Carpinella, M.C., 2011. Tyrosinase inhibitory activity of a 6-isoprenoid-substituted flavanone isolated from *Dalea elegans*. *Bioorg. Med. Chem.* 19, 3474-3482.
6. del Corral, S., Cuffini, S.L., Cardoso, S.G., Bortoluzzid, A.J., Palacios, S.M., 2012. Phytotoxic halimanes isolated from *Baccharis salicifolia* (Ruiz & Pad.) Pers. *Phytochemistry Letters* 5, 280-283.

7. Díaz Napal, G.N., Carpinella, M.C., Palacios, S.M., 2009. Antifeedant activity of ethanolic extract from *Flourensia oolepis* and isolation of pino-cembrin as its active principle compound. *Biores. Technol.* 100, 3669-3673.
8. Joray, M.B., González María Laura, Trucco Lucas, Palacios Sara María, Bocco José Luis, Cecilia, C.M., 2012. Estudio de la actividad citotóxica de compuestos obtenidos a partir de plantas nativas y naturalizadas de la región central de Argentina. . VII International Symposium on Natural Products Chemistry and its Applications.
9. Joray, M.B., González, M.L., Palacios, S.M., Carpinella, M.C., 2011. Antibacterial Activity of the Plant-Derived Compounds 23-Methyl-6-O-des-methylauricepyrone and (Z,Z)-5-(Trideca-4,7-dienyl)resorcinol and Their Synergy with Antibiotics against Methicillin-Susceptible and -Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 11534-11542.
10. Joray, M.B., Palacios, S.M., Carpinella, M.C., 2013. Understanding the interactions between metabolites isolated from *Achyrocline satureioides* in relation to its antibacterial activity. *Phytomedicine* 20, 258-261.
11. Miao, Z.-H., Ding, J., 2003. Transcription Factor c-Jun Activation Represses *mdr-1* Gene Expression. *Cancer Research* 63, 4527-4532.
12. Su, Y., Cheng, X., Tan, Y., Hu, Y., Zhou, Y., Liu, J., Xu, Y., Xie, Y., Wang, C., Gao, Y., Wang, J., Cheng, T., Yang, C., Xiong, D., Miao, H., 2012. Synthesis of a Dual Functional Anti-MDR Tumor Agent PH II-7 with Elucidations of Anti-Tumor Effects and Mechanisms. *PLoS ONE* 7, e32782.

ESTUDIO DEL EFECTO TERAPÉUTICO DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* CECT7121 SOBRE MODELOS DE ALERGIA

Castro, Marisa Silvia; Díaz, Alién Magalí; Mourelle, Ana Carolina; Molina, Matías Alejandro, Manghi, Marcela Alejandra.

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral "Prof. Dr. Ricardo A. Margni" (IDEHU, CONICET-UBA). Cátedra de Inmunología, FFyB, UBA.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los individuos alérgicos presentan un desequilibrio en la respuesta inmune hacia un perfil de citoquinas Th2 que induce la producción aumentada de IgE y el reclutamiento de células efectoras al sitio de inflamación alérgica [Michail (2009), Nonaka (2008), Crestani (2007)]. Contrariamente, los individuos saludables favorecen la producción de citoquinas Th1 en respuesta a los alérgenos [Imada (1995)]. Aunque la etiología exacta de las enfermedades alérgicas permanece desconocida, algunos investigadores proponen que además de una predisposición hereditaria, la exposición ambiental puede ser un factor gatillante teniendo en cuenta que la exposición a los microorganismos tiene un rol crucial en la maduración del sistema inmune. Esta propuesta concuerda con la "hipótesis higiénica" que sugiere que la reducción en el tamaño familiar y en las infecciones en la niñez ha disminuido la exposición a los microorganismos [Michail (2009), Yeun (2008), Guarner (2006)]. Teniendo en cuenta que el consumo de alimentos fermentados o de bacterias acidolácticas (probióticos) puede inmunomodular la respuesta inmune induciendo una mayor secreción de IFN γ [Cross (2001)], se puede presumir que este mecanismo serviría para regular *in vivo* respuestas exageradas de tipo Th2 y por lo tanto ayudar a combatir las respuestas alérgicas. Por lo tanto, una terapia alternativa empleando microorganismos probióticos podría brindar una estimulación segura para prevenir las alergias y para aliviar los síntomas.

En trabajos previos hemos demostrado que *Enterococcus faecalis* CECT7121, cepa ambiental no patogénica, se implanta y persiste en el intestino de ratones BALB/c estimulando al sistema inmune innato e induciendo la síntesis de IL-10 e IL-12 [Sparo (2008), Castro (2007)]. Además, hemos demostrado el efecto adyuvante de *E. faecalis* CECT7121 y su amplia activi-

dad inmunomoduladora pro-Th1 logrando efectos benéficos sobre distintos modelos biológicos: * reduce notoriamente la morbilidad y mortalidad de los ratones desafiados con dosis letal de *Salmonella* serotipo Enteritidis [Castro (2007)], * reduce la mortalidad de los animales pre-tratados ip y desafiados con una dosis letal del linfoma T murino LBC generando una respuesta inmune específica de tipo Th1, con producción de elevados niveles de IL-12 e IFN γ [Castro (2009)], * genera en animales inmunizados con vacuna DTPw, una mayor respuesta celular de memoria anti-tetánica y anti-diftérica de memoria sesgando la producción de citoquinas hacia una respuesta de preponderantemente de tipo Th1 [Castro (2008)].

Recientemente, hemos estudiado el efecto de *E. faecalis* CECT7121 en un modelo murino de alergia sistémica en el que los animales fueron tratados intragástricamente con la cepa bacteriana antes y durante el plan de inmunización sc con Ovalbúmina (Ova). En ese modelo demostramos que *E. faecalis* CECT7121 disminuye los niveles de IgE específica mientras incrementa los niveles de IgG2a anti-Ova, disminuye la proliferación específica de esplenocitos y la secreción de citoquinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) [Castro (2012)]. Además, in vivo observamos que los animales tratados con la cepa bacteriana presentaron una reacción de anafilaxia sistémica cutánea menos intensa que los animales control [Castro (2012)].

En este proyecto se apunta a estudiar el posible efecto terapéutico de la cepa inmunomoduladora *E. faecalis* CECT7121 en el modelo de alergia sistémica ya puesto a punto en nuestro laboratorio. Por otra parte, se estudiará el potencial efecto protector de *E. faecalis* CECT7121 en un modelo de alergia alimentaria.

METODOLOGÍA

Efecto del tratamiento con *E. faecalis* CECT7121 sobre un modelo de alergia sistémica:

- Cultivo de *E. faecalis* CECT7121: *E. faecalis* CECT7121 fue crecido en caldo tripticasa soya (18 h, 37°C). El sedimento bacteriano se obtuvo por centrifugación y posteriores lavados con PBS estéril. La suspensión de trabajo será ajustada mediante determinación de DO como se describió previamente [Castro (2007)].

- Todos los estudios fueron realizados con ratones BALB/c (6 semanas de vida) provenientes de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA.
 - Administración de *E. faecalis* CECT7121: los animales recibirán por vía intragástrica (ig) 200 µl de una suspensión de *E. faecalis* CECT7121 ajustada a una concentración de 3.10 UFC/ml.
- a- *Inoculaciones: en paralelo en animales vírgenes y tratados*: los días 0, 7 y 21 los animales recibieron por vía subcutánea (sc) un volumen de 200 µl de Ovalbúmina (Ova) (10 µg Ova + 1 mg Al(OH)₃). Los días 1, 2 y 3; y los días 12, 13 y 14 del plan, un grupo de ratones fue inoculado con la suspensión de trabajo de *E. faecalis* CECT7121 (ig) mientras que el grupo control recibió SF.
- b- *Estudios a nivel sistémico*: el día 32 post-primera inmunización los animales fueron sacrificados para obtener muestras de suero y bazo. Se evaluó en suero los niveles de IgG1, IgG2a e IgE específicos mediante ELISA, en células de bazo la proliferación linfocitaria anti-Ova por incorporación de H-timidina, y en los sobrenadantes de esplenocitos los niveles de citoquinas (IL-5, IL-13, IL-10, IFN γ) mediante ELISA.
- c- *Estudios in vivo*: en otros grupos de animales se evaluó la protección mediante la reacción de anafilaxia cutánea activa para lo cual los animales sensibilizados y tratados con *E. faecalis* CECT7121 (y control) se inocularon por vía intradérmica (id) con 50 µl de Ova (1 mg/ml) en la oreja derecha (en la izquierda se inoculó PBS como control), e inmediatamente después se les administró por vía intravenosa una solución de azul de Evans. Treinta minutos después se evaluó la intensidad de la reacción.

RESULTADOS

Efecto del tratamiento con *E. faecalis* CECT7121 sobre el modelo de alergia sistémica

El día 34 después de la primer inmunización con OVA y el protocolo de tratamiento con *E. faecalis* CECT7121, estudiamos parámetros propios de la respuesta inmune Th1 y Th2.

A nivel sérico determinamos los niveles de anticuerpos específicos de isotipo IgG1 (propio de un perfil Th2) así como IgG2a (Th1). Si bien no encontramos diferencias significativas en los títulos de IgG1 anti-OVA entre los grupos inmunizados, los niveles de IgG2a específica fueron mayores en los animales inmunizados con OVA y tratados con *E. faecalis* CECT7121 (Tabla 1). La relación IgG1/IgG2a específica fue por lo tanto, significativamente diferente entre los grupos de animales inmunizados. El análisis de otro isotipo de inmunoglobulina Th2, IgE, no arrojó diferencias significativas entre los animales inmunizados (Tabla 1). No detectamos anticuerpos específicos en los animales no inmunizados, tratados o no con *E. faecalis* CECT7121.

Tabla 1. Determinación de los niveles de IgE, IgG, IgG1 e IgG2a específicos medidos por ELISA en los sueros de los animales inmunizados con Ova tratados o no con *E. faecalis* CECT7121.

	S/OVA	<i>E. faecalis</i> CECT7121/OVA
IgE anti-OVA (DO)	0.553 $\pm$ 0.277	0.629 $\pm$ 0.367
IgG anti-OVA (título)	108988 $\pm$ 15563	93561 $\pm$ 12610
IgG1 anti-OVA IgG1 (título)	67057 $\pm$ 31528	59452 $\pm$ 34763
IgG2a anti-OVA (título)	5425 $\pm$ 2315*	7835 $\pm$ 3709
IgG1 anti-Ova/IgG2 anti-OVA	12.70 $\pm$ 4.88 *	8.26 $\pm$ 4.08

Los datos representan las medias $\pm$ SEM (n:12). * $p < 0.05$, Student's *t*-test

La proliferación celular luego de la estimulación con OVA no difirió entre los esplenocitos de los animales inmunizados tratados con *E. faecalis* CECT7121 e inmunizados no tratados (Figura 1).

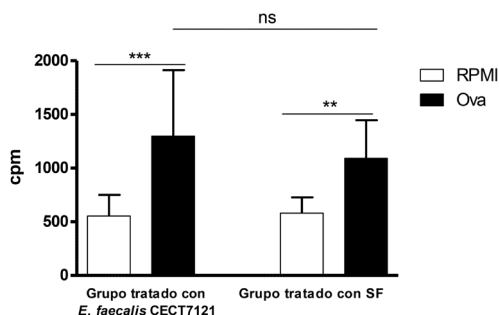


Figura 1: Respuesta celular. El día 34 después de la primera inmunización, las células esplénicas de cada animal inmunizado fueron obtenidas e incubadas con medio de cultivo (RPMI) o con OVA. Se estudiaron 5 animales de cada grupo en cada ensayo. Los resultados son expresados como la media de las cpm $\pm$ SEM. *** $p < 0.001$, Kruskal-Wallis seguido por el test Dunns de comparaciones múltiples.

Más aún, después de la estimulación específica los esplenocitos fueron capaces de secretar las citoquinas Th2 IL-5 e IL-13 y la citoquina regulatoria IL-10. Sin embargo, no encontramos diferencias entre los grupos (Figura 2).

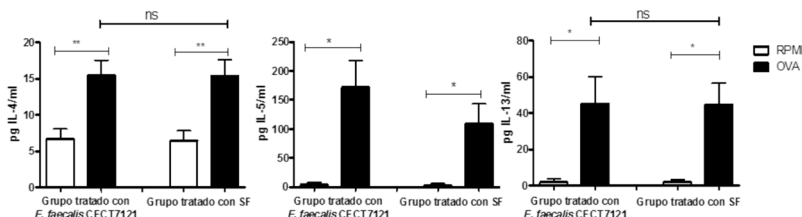


Figura 2: Producción de citoquinas Th2. Los niveles de IL-4, IL-5 e IL-13 fueron medidos por ELISA en los sobrenadantes de cultivo de las células esplénicas después de la incubación con medio de cultivo (RPMI) o con OVA por 72 h. Se estudiaron 5 animales por grupo en cada ensayo. Los resultados son expresados como la media de los pg/ml $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Kruskal-Wallis seguido por el test Dunns de comparaciones múltiples.

Luego de realizar el test de ACA, el tratamiento con la bacteria no mostró tener efecto desensibilizante sobre los animales tratados con OVA (Figura 3).

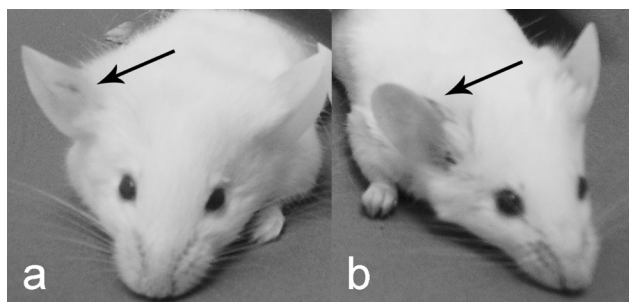


Figura 3: Anafilaxia Cutánea Activa. Después de la inoculación intravenosa de 50 μ l de Azul de Evans, la reacción de ACA fue inducida por el desafío intradérmico con el alérgeno en la oreja derecha (OVA, 1 mg/ml, 50 μ l), mientras que en la oreja izquierda se inoculó PBS como control. Los animales fueron observados después de 30 minutos de ser inoculados. A) Grupo inmunizado control (S/OVA), B) Grupo inmunizado y tratado con *E. faecalis* CECT7121. Las flechas indican los sitios de inoculación con OVA.

DISCUSIÓN

El desarrollo de la respuesta alérgica puede dividirse en dos fases. La primera es la fase de sensibilización, donde los LT CD4⁺ son activados y diferenciados a células Th2 secretoras de IL-4, IL-5 e IL-13. Estas citoquinas propias del perfil Th2 favorecerán la secreción por parte de los LB de los isotipos de inmunoglobulinas IgE e IgG1. Las células basófilas y los mastocitos presentan en su superficie el receptor de alta afinidad para IgE y por lo tanto dicha Ig se une rápidamente a la membrana de dichas células. Frente a una segunda exposición al alérgeno ocurre la fase efectora sintomática. En esta fase, luego de la unión del alérgeno a la IgE unida al FcεR1, ocurre el cross-linking del R1 llevando a la activación celular y la subsecuente degranulación de estas células con la liberación de mediadores como histamina que genera todas las manifestaciones clínicas de la alergia.

La bacterioterapia con microorganismos probióticos puede ser utilizada para modular ya sea la fase de sensibilización así como la efectora. La actividad inmunomoduladora de las cepas probióticas sobre las respuestas alérgicas así como la ventana de tiempo en donde tienen eficacia es dependiente de la cepa en estudio. Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que, la administración intragástrica de *Enterococcus faecalis* CECT7121 previa a la sensibilización con ovalúmina, disminuye el establecimiento de la respuesta inmune alérgica [Castro (2012)]. El objetivo de este trabajo fue estudiar en el mismo modelo murino de sensibilización, el efecto terapéutico de *E. faecalis* CECT7121 en la fase efectora de la respuesta alérgica.

En este trabajo no se encontraron diferencias en los niveles séricos específicos de las inmunoglobulinas propias de un perfil Th2, IgE e IgG1, entre los grupos inmunizados control o tratados con *E. faecalis* CECT7121. La disminución observada en la relación IgG2a anti-OVA/ IgG1 anti-OVA fue a expensas del aumento del título de IgG2a observado en el grupo inmunizado y tratado con la cepa en estudio. El aumento de este isotipo de inmunoglobulina está en línea con la ya reportada acción pro-Th1 de *E. faecalis* CECT7121 [Castro (2007), Castro (2008), Castro (2010)].

Con respecto a los niveles de citoquinas, el tratamiento con *E. faecalis* CECT7121 luego de la inmunización con OVA no logró disminuir la producción de las citoquinas estudiadas. Estos resultados concuerdan con los niveles de IgE específica determinados ya que IL-4, IL-5 e IL-13 son citoquinas implicadas en la síntesis de IgE [Levine (2010), Crestani (2007)].

El test *in vivo* de anafilaxia sistémica tiene importancia ya que otros

autores trabajando con *Lactococcus lactis* NCC2287 en un modelo murino de alergia alimentaria han reportado que dicho microorganismo fue capaz de disminuir los síntomas de alergia aun cuando no se observara reducción en los niveles de anticuerpos específicos [Zuercher (2012)]. *E. faecalis* CECT7121 no disminuyó las manifestaciones alérgicas. El test de ACA indicó que los animales del grupo OVA/*E. faecalis* CECT7121 *versus* el grupo OVA/SF tenían la misma extravasación de colorante, por lo que se infiere la misma vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular como consecuencia de la degranulación de los mastocitos.

Nuestros resultados demuestran que la implantación previa de *E. faecalis* CECT7121 pareciera ser esencial para que esta cepa bacteriana ejerza su efecto inmunomodulador.

Considerando nuestros resultados conjuntamente con los recientemente publicados acerca del efecto preventivo de *E. faecalis* CECT7121 sobre el desarrollo de la alergia [Castro (2012)], se puede concluir que esta cepa bacteriana no es útil como bacterioterapia para el manejo de las manifestaciones alérgicas. Nuestros resultados refuerzan la hipótesis de que cada cepa probiótica puede tener una acción diferencial y especializarse en inmunomodular las diferentes fases de la respuesta alérgica.

ABSTRACT

In allergies, an unbalanced immune response towards a Th2 profile with high levels of IgE is produced. We have demonstrated that the previous administration of *E. faecalis* CECT7121 prevents the development of allergy in ovalbumin-immunized mice. In this work, we evaluated whether this bacterium can also revert an established allergic status. Mice were immunized with OVA and after that, were inoculated with an *E. faecalis* CECT7121 suspension. In immunized animals, serum specific immune response, proliferative activity of memory splenocytes, and levels of Th2 cytokines were assessed. The *in vivo* active cutaneous anaphylaxis test was also performed. The treatment with *E. faecalis* CECT7121 only increased anti-OVA IgG2a levels. No differences were observed in other specific immunological parameters. Probiotic-treatment did not prove to have any desensitizing effect on mice. These results, together with those recently published, it can be concluded that this bacterium would not be appropriate for the treatment of allergic symptoms.

REFERENCIAS

1. Castro M., Sparo M., Molina M., Andino J., & Manghi M. (2007). *Enterococcus faecalis* CECT7121 induces systemic immunomodulatory effects and protects from *Salmonella* infection. *Int J Probiotics Prebiotics*, 2, 215-224.
2. Castro M.S., Molina M.A., Di Sciullo P., Azpiroz M.B., Leocata Nieto F., Sterin-Speziale N.B., Mongini C., & Manghi M.A. (2010). Beneficial activity of *Enterococcus faecalis* CECT7121 in the anti-lymphoma protective response. *J Appl Microbiol*, 109, 1234-1243.
3. Castro M., Molina M., Sparo M., Manghi M. (2008). Effects of *Enterococcus faecalis* CECT7121 on the specific immune response after DTPw vaccination. *Int J Probiotics Prebiotics*, 3, 25-30.
4. Castro M.S., Azpiroz M.B., Molina M.A., Mourelle A.C., Alaniz F.S., Maldonado A.M., & Manghi M.A. (2012). Preliminary studies on the prevention of the Ovalbumin-Induced allergic response by *Enterococcus faecalis* CECT7121 in mice. *Int Arch Allergy Immunol*, 157, 11-20.
5. Crestani E., Lohman C.I., Guerra S., Wright A.L., & Halonen M. (2007). Association of IL-5 cytokine production and *in vivo* IgE levels in infants and parents. *J Allergy Clin Immunol*, 120, 820-826.
6. Cross M.L., Stevenson L.M., & Gill H.S. (2001). Anti-allergy properties of fermented foods: an important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria? *Int Immunopharmacol*, 1, 891-901.
7. Gould H.J., Sutton B.J., Beavil A.J., Beavil R.L., McCloskey N., Coker H.A., Fear D., & Smurthwaite L. (2003). The biology of IgE and the basis of allergic disease. *Annu Rev Immunol*, 21, 579-628.
8. Guarner F., Bourdet-Sicard R., Brandtzaeg P., Gill H.S., McGuirk P., van Eden W., Versalovic J., Weinstock J.V., & Rook G.A.W. (2006). Mechanisms of disease: the hygiene hypothesis revisited. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 3, 275-284.
9. Imada M., Estelle F., Simons R., Jay F.T., & Hayglass K.T. (1995). Allergen-stimulated interleukin-4 and interferon- γ production in primary culture: responses of subjects with allergic rhinitis and normal controls. *Immunol*, 85, 373-380.
10. Levine S.J., & Wenzel S.E. (2010). Narrative Review: The role of Th2 immune pathway modulation in the treatment of severe asthma and its phenotypes. *Ann Intern Med*, 152, 232-237.
11. Michail S. (2009). The role of probiotics in allergic diseases. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 5, 5-11.

12. Nonaka Y., Izumo T., Izumi F., Maekawa T., Shibata H., Nakano A., Kishi A., Akatani K., & Kiso Y. (2008). Antiallergic effects of *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84 mediated by modulations of Th1/Th2 immunobalance and inductions of IL-10 production. *Int Arch Allergy Immunol*, 145, 249-257.
13. Sparo M., Nuñez G.G., Castro M., Calcagno M.L., García Allende M.A., Ceci M., Najle R., & Manghi M. (2008). Characteristics of an environmental strain, *Enterococcus faecalis* CECT7121, and its effects as additive on craft dry-fermented sausages. *Food Microbiol*, 25, 607-615.
14. Wang C.C., & Rook G.A.W. (1998). Inhibition of an established response to ovalbumin in BALB/c mice by killed *Mycobacterium vaccae*. *Immunol*, 93, 307-313.
15. Yeun K.J., Choi Y.O., & Ji G.E. (2008). Effect of oral probiotics (*Bifidobacterium lactis* AD011 and *Lactobacillus acidophilus* AD031) administration on ovalbumin-induced food allergy mouse model. *J Microbiol Biotechnol*, 18, 1393-1400.
16. Zuercher A.W., Weiss M., Holvoet S., Moser M., Moussu H., van Overtvelt L., Horiot S., Moingeon P., Nutten S., Prioult G., Singh A., & Mercenier A. (2012). *Lactococcus lactis* NCC 2287 alleviates food allergic manifestations in sensitized mice by reducing IL-13 expression specifically in the ileum. *Clin Develop Immunol*, 2012:485750. Epub 2011 Sep 22.

Producción

Los resultados obtenidos conforman parte de:

* Tesis de Licenciatura de la Licenciada Ailén Magalí Díaz ("**Estudio del posible efecto terapéutico de *Enterococcus faecalis* CECT7121 sobre un modelo de alergia sistémica**"). Defensa: Marzo 2013, Calificación: Sobresaliente.

* **Estudio del efecto preventivo y terapéutico de *Enterococcus faecalis* CECT7121 en un modelo de alergia sistémico.** Castro MS, Díaz AM, Molina MA, Nuñez GG, Mourelle AC, Manghi MA. Reunión Anual de la SAI, Mar del Plata, Noviembre 2012.

IMPORTANCIA DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA EN LA REGULACIÓN DE LOS PROCESOS DE OSTEOGÉNESIS, OSTEOCLASTOGÉNESIS Y RESORCIÓN ÓSEA EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA AVANZADO

Fernández-Vallone VB, Martínez LM, Labovsky V, Bordenave RH, Feldman L, Batagelj E, Dimase F, Rodríguez Villafañe A, Chasseing NA.

Instituto de Biología y Medicina Experimental, Vuelta de Obligado 2490, CP 1428, CABA, Argentina.

OBJETIVO GENERAL

Fue continuar estudiando las modificaciones que se producen en la diferenciación y función de las células estromales mesenquimales [CEM= células madre mesenquimales (MSC), progenitores y precursores mesenquimales] de médula ósea (MO), en particular las relacionadas con la autorrenovación de las MSC, diferenciación osteogénica y la formación de osteoclastos (OC), durante el desarrollo del cáncer de mama ductal infiltrante en pacientes con estadio clínico-patológico avanzado, previo a la cirugía del tumor, libres de tratamiento, sin metástasis en MO y hueso, menopáusicas y sin enfermedades que afecten el metabolismo óseo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para realizar los mismos se trabajó con aspirados de MO de cresta ilíaca posterior y sangre periférica (SP) de pacientes con cáncer de mama (PCM) de las características antes descriptas y voluntarias sanas (VS, donantes para trasplante alogénico de MO o VS pero que no poseen ningún compromiso medular ni óseo).

Los objetivos específicos son:

- 1- Continuar analizando que factores podrían ser en parte responsables de la deficiente autorrenovación o capacidad de clonado y del deficiente potencial osteogénico de las CEM de MO de las PCM avanzado para dar osteoblasto (Ob)-osteocito

- a)- Completar el estudio de la expresión de Dickkopf-1 (Dkk-1) y catenina- β (catenina) fosforilada o no, en los cultivos de CEM del 1, 3 [cultivo de CEM a baja densidad celular donde predominan las MSC-multipotenciales] y 4 pasaje (en medio osteogénico) de MO de las PCM y VS.
- 2- Continuar analizando en PCM avanzado si la presencia del tumor modifica la capacidad de diferenciación a OC de los progenitores hematopoyéticos mielo-monocíticos de MO y de los monocitos (CD14+) de SP. Caracterización fenotípica y funcional de los OC
- a)- Completar el estudio del potencial osteoclastogénico de los progenitores hematopoyéticos de MO de PCM y VS caracterizando los OC obtenidos y analizando su funcionalidad.
La caracterización del OC maduro se hará evaluando la expresión de metaloproteinasa -9 (MMP-9), tirosina quinasa c-Src y vitronectina (integrina $\alpha V\beta 3$). Y la funcionalidad por su capacidad de formar y acidificar la laguna de resorción.
 - b)- Completar el estudio del potencial osteoclastogénico de los monocitos (CD14+) de SP de PCM y VS caracterizando los OC obtenidos y analizando su funcionalidad.
 - c)- Cuantificar los niveles de ligando de receptor activador para el factor nuclear kappa B (RANKL) en los medios condicionados (MCo) de 5d de los cultivos de progenitores hematopoyéticos mielomonocíticos de MO de las PCM y VS, así como en los MCo de 3d de los cultivos de monocitos de SP de ambos grupos, específicamente en los cultivos donde hubo diferenciación osteoclastogénica espontánea. De no ser cuantificable el RANKL soluble se estudiará el mecanismo de diferenciación RANKL dependiente mediante bloqueo de este factor con anticuerpo (Ac) anti-RANKL (contra un dominio presente tanto en RANKL soluble como de membrana) y Osteoprotegerina recombinante humana (OPGrh).
 - d)- Cuantificar la presencia de preosteoclastos (POC; RANK+, CD61/CD51+, CD11b+, c-fms+) en la MO de las PCM y VS a partir de las células mononucleares (CMN) de MO y de los monocitos-CD14+ de SP.
- 3- Continuar analizando si en las PCM avanzado la presencia del tumor modifica el sistema RANKL (factor osteoclastogénico por excelencia)–

OPG [receptor (R) soluble de RANKL soluble y de membrana] y otros factores reguladores de la osteoclastogénesis en forma directa o indirecta a través del incremento de RANKL

- a)- Completar el estudio de algunos factores que regulan la osteoclastogénesis, evaluando sus niveles en plasma de MO y SP de PCM y VS: RANKL, OPG, interleuquina-7 (IL-7), IL-17, factor de crecimiento derivado de las plaquetas-AB (PDGF-AB), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β), factor de crecimiento granulocítico-macrófago (GM-CSF), factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), molécula de adhesión de células vasculares de tipo-1 (VCAM-1), molécula de adhesión intercelular de tipo-1 (ICAM-1), proteína quimioattractante de monocitos (CCL-2/MCP-1), IL-4, IL-10, interferón-gamma (INF- γ) , proteína quimioattractante selectiva de Linfocitos T de memoria y monocitos (CCL-5 /RANTES) y galactina- 3.
- b)- Completar los estudios de la expresión de RANKL y OPG en los cultivos de CEM del 1 , 3 y 4 pasaje de MO de PCM y VS.
- c)- Evaluar los niveles de MMP-9 y galactina-3 en los MCo de 7 y 14 días de los cultivos de las unidades formadoras de colonias fibroblásticas (1 CFU-F= 1 MSC) de MO de las PCM y VS. Así como la actividad gelatinolítica de MMP-9 (pro y activa).
- d)- Estudiar en células epiteliales tumorales mamarias y estromales presentes en las biopsias de tumores primarios de las PCM estadio clínico-patológico avanzado (III-B) antes mencionadas, la presencia de RANKL, así como en tejido mamario no neoplásico.

INTRODUCCIÓN

Hasta el momento no se había descrito si anterior al desorden óseo que implica la invasión tumoral y desarrollo de la metástasis óseas (MTsO) en las PCM avanzado, existe una alteración del potencial osteogénico de la MSC de MO y/o en su migración al hueso afectado, así como que pasa con la formación de OC a partir del progenitor mielo-monocítico de MO y monocitos-CD14+ de SP. Nosotros fuimos los primeros en observar que las MSC que quedan en MO de las PCM en estadios avanzados, sin tratamiento, y previa a la aparición de MTsO, eran las de *menor capacidad de autorrenovación o clonado para dar CFU-F* [<número de CFU-F y <tamaño/colonia, <produc-

ción de Dkk-1 y factor derivado de células estromales tipo-1 (SDF-1), ambos factores que favorecen la autorrenovación de MSC], *menor sobrevida* (<producción de SDF-1 y Dkk-1) y *menor migración* (<producción de SDF-1), así como *menor capacidad de diferenciación osteogénica y formación de matriz de mineralización ósea* (aumento de Dkk-1 en el medio de diferenciación osteogénica) *paralelo a un incremento de la diferenciación osteoclástica de las células hematopoyéticas de MO y de monocitos de SP* de estas PCM favorecida por un *incremento de la expresión de RANKL-membrana/ MSC* vs. las MSC de VS. Además, hemos observado que estas PCM, en las circunstancias antes descritas, presentaron un <% de MSC con fenotipo-CD146+ (marcador de MSC del nicho vascular) así como una disminución del índice de fluorescencia relativa de CD146. Datos que indicarían que estas PCM presentan un menor número de MSC del nicho vascular previo a la MTsO. La mayor intensidad de fluorescencia relativa de CD146/MSc fue encontrada en las MSC que presentan triple plasticidad y mayor autorrenovación, así como mayor capacidad de regular la hematopoyesis en comparación a las que expresan menor intensidad de fluorescencia relativa que corresponden a las MSC unipotenciales de baja eficiencia de clonado (1). Observaciones que nos hacen pensar que en estas PCM previa a las MTsO existe un menor reservorio de MSC con alta autorrenovación, sobrevida, migración y multipotencialidad posiblemente pues al inicio del desarrollo tumoral hayan migrado las más efectivas al tumor primitivo. De todo lo expuesto surge que las MSC que quedan en MO, en este momento del desarrollo tumoral, tienen como función principal modificar el metabolismo óseo, disminuyendo su diferenciación osteogénica y favoreciendo la osteoclastogénesis, eventos claves para las MTsO (2-4). Resultados que indican la necesidad de continuar profundizando sobre el papel que cumplen las MSC de MO en la evolución de las MTsO en las PCM avanzado.

RESULTADOS GENERALES

- 1) Los defectos a nivel de la autorrenovación y proliferación de las MSC observados en las PCM en comparación con las VS, podrían deberse a:
 - un aumento de la relación β -catenina fosforilada/ β -catenina total a nivel de las CEM (MSC/ progenitores estromales mesenquimales) del 1 subcultivo de MO de las PCM;

2) El defecto en la plasticidad, relacionada especialmente al proceso de osteogénesis, el cual es importante para la regeneración ósea al momento de evitar el avance de las metástasis osteolíticas o incluso su establecimiento, podría deberse al menos a:

un aumento en los niveles de PDGF-AB, ICAM-1 y CCL-2 en plasma de MO de las PCM, los cuales inhibirían la completa maduración de los pre-Ob hacia Ob/osteocitos, evitando la formación de hueso e incluso exacerbando el proceso de osteoclastogénesis;

un aumento de los niveles de Dkk-1 liberado por las MSC provenientes de MO de las PCM cuando se las induce a la diferenciación osteogénica;

3) El estudio del proceso de osteoclastogénesis en PCM respecto al de las VS, como contrapartida del proceso de osteogénesis, resultó:

En un aumento en los procesos de osteoclastogénesis espontánea tanto a nivel de MO como de SP en las PCM respecto a las VS, obteniéndose en cada uno de los procesos OC maduros y funcionales. Aumento que podría deberse, como encontramos en las PCM, a:

Un incremento en el “pool” de pre-OC presentes en MO y en circulación.

Un desbalance en líneas generales de la relación RANKL/OPG, que está aumentada en las PCM, contribuyendo así a la activación del proceso de osteoclastogénesis.

Un aumento de los niveles de ciertos factores osteoclastogénicos tales como PDGF-AB, VCAM-1, ICAM-1, CCL-2, MIF y de la actividad de la MMP-9, así como la disminución de factores anti-osteoclastogénicos, como IL-10 y galactina-3, fundamentalmente en el plasma de MO, observaciones que podrían favorecer el aumento de osteoclastogénesis observado en las PCM, un eje sumamente importante a la hora de evaluar el desbalance óseo en función de las posibles metástasis osteolíticas que estas pacientes son plausibles de sufrir.

CONCLUSIÓN GENERAL

El entender los factores que gobiernan la progresión tumoral desde el inicio del nicho pre-metastásico y la formación de micro-metástasis hasta el establecimiento de las lesiones óseas producidas por las metástasis puede proveer de nuevas herramientas en el manejo del cáncer de mama. A lo largo de este trabajo ha quedado plasmado el hecho de que una aproximación basándose solamente en las propiedades de las células tumorales es insuficiente. El contexto de las mismas debe ser considerado, tanto en el sitio del tumor primario, como en el nicho pre-metastásico.

El microambiente hematopoyético es el nicho pre-metastásico de las PCM cuya evolución implica lesiones osteolíticas provocadas por el tumor como metástasis. La permisividad de este nicho para la inserción de las células tumorales, así como los mecanismos que regule para la latencia o progresión tumoral luego de la invasión son las claves de este proceso.

Así, en el transcurso de este trabajo hemos podido dar evidencias de que la principal implicada como reguladora y promotora del avance tumoral a nivel de MO es la MSC.

Las PCM avanzado poseen una reserva medular de MSC alterada que conduce principalmente a un desbalance óseo a favor de la osteoclastogénesis. Las MSC presentes en la MO de las PCM tienen disminuida su capacidad de autorrenovación, su plasticidad, capacidad de migración y de regular una hematopoyesis adecuada, lo cual no deja de ser una gran complicación a la hora de afrontar los tratamientos quimioterápicos. La incapacidad para completar el proceso de osteogénesis y, por ende, formar una matriz de mineralización adecuada implica el primer paso en la falla de la homeostasis ósea la cual por supuesto repercute en su contrapartida que es la resorción, dado que las mismas MSC regulan este proceso.

Si bien es posible que al inicio de la patología las MSC de MO hayan contribuido a favorecer el microambiente del tumor primario, queda aquí demostrado que en el estadio avanzado la MSC tiene como función principal conducir y favorecer la aparición y desarrollo de MTsO.

Nos aproximamos a una era en la cual la terapia busca ser adaptada cada vez más a las características individuales de cada paciente con su tipo de tumor y contexto tumoral. Por lo tanto, el identificar cuáles tumores y, como consecuencia, cuáles pacientes se encuentran ante mayor riesgo de complicaciones óseas implica una gran promesa para el tratamiento y manejo del cáncer de mama, incluso desde estadios tempranos.

ABSTRACT

Bone is the most suitable site for osteolytic bone metastasis in advanced breast cancer patients (BCP). Mesenchymal stem cells (MSC) from bone marrow (BM) regulate osteogenesis and osteoclastogenesis processes. An imbalance in bone homeostasis favors a pre-metastatic niche ideal for arrival and proliferation of breast cancer cells.

This research confirms that low cloning capacity of MSC from BCP to give fibroblastic-colony forming units (CFU-F) and also the lower osteogenic differentiation capacity of BCP's MSC compared to those from healthy volunteers (HV) could be related to Dkk-1 and β -catenin. In addition, the inefficient osteogenic differentiation capacity of BCP-MSC could be consequence of the higher levels of PDGF-AB, ICAM-1 and CCL-2 found in BM plasma of these patients compared to the values of HV. In addition, these BCP presented spontaneous osteoclastogenesis and it could be produced by higher number of pre-osteoclasts in BM and peripheral blood (PB), by higher RANKL/OPG relation, and by other factors such as RANKL, MIF, PDGF-AB, VCAM-1, ICAM-1, CCL-2, MMP-9, IL-10, and galactin-3.

MSC from non-metastatic and non-treated BCP may regulate the development of bone metastasis. So, the identification of predictive factors through patient's BM-MSC study, spontaneous osteoclastogenesis in BM and PB study, and study of involved factors; may be an approach for early detection and quality life improvement.

REFERENCIAS

1. Russell KC, Phinney DG, Lacey MR, Barrilleaux BL, Meyertholen KE, O'Connor KC. In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. **Stem Cells** 2010, 28: 788-798.
2. Hofer EL, Labovsky V, LaRussa VJ, Fernández Vallone VB, Honegger AE, Belloc CG, Wen H CH, Bordenave RH, Bullorsky EO, Feldman L, Chasseing NA. Mesenchymal stromal cells, colony-forming unit fibroblasts, from bone marrow of untreated advanced breast and lung cancer patients suppress fibroblast colony formation from healthy marrow. **Stem Cells Dev** 2010, 19: 359-370.
3. Fernández Vallone VB, Otaegui J, Lavovsky V, Dimase F, Batgelj E,

Feldman L, Bordenave RH, Chasseing NA. Osteoclastogénesis espontánea de monocitos de sangre periférica y células mononucleares de médula ósea en pacientes con cáncer de mama avanzado, sin compromiso óseo. **Libro de Anales de la Fundación Roemmers** 2010, pag 153-167.

4. Fernández Vallone VB, Hofer EL, Choi H, Bordenave RH, Btagelj E, Feldman L, LaRussa V, Caramutti D, Dimase F, Labovsky V, Martinez LM, Chasseing NA. Behaviour of mesenchymal stem cells from bone marrow of untreated advanced breast and lung cancer patients without bone osteolytic metastasis. **Clin & Exp Metastasis** 2013, 30: 317-332.

ESTRATEGIAS PARA DESENMASCARAR LA INMUNOGENICIDAD DE UN TUMOR MURINO NATURALMENTE NO INMUNOGÉNICO

Dra. Paula Chiarella

Instituto de Leucemia Experimental (ILEX), Academia Nacional de Medicina de
Buenos Aires, Argentina.

Desde hace muchos años se sabe que es posible desarrollar vacunas para prevenir la aparición de tumores experimentales en animales de laboratorio (1). Asimismo, en el hombre, se han desarrollado exitosos protocolos de vacunación contra el virus de la hepatitis B que redujeron significativamente la incidencia de hepatocarcinomas en áreas donde la infección precoz con el virus y la existencia de tumores hepáticos estaban fuertemente correlacionadas (2). Sin embargo, la mayoría de los intentos por aplicar vacunas, no ya en forma preventiva, sino con un propósito terapéutico para tratar tumores establecidos, no han resultado, hasta hoy, exitosos, ni en animales ni en seres humanos (3).

Este fracaso ha sido observado tanto con tumores experimentales fuertemente antigénicos –como por ejemplo, tumores murinos inducidos por dosis masivas de carcinógenos químicos y virales– como con tumores de origen espontáneo. Diferentes mecanismos inmunosupresores se han invocado para explicar la refractariedad de los individuos portadores de tumores establecidos fuertemente antigénicos a las terapias inmunológicas. Por ejemplo, la expresión aumentada de células supresoras del tipo de T reg. o NKT, la aparición de células mieloides inmaduras supresoras (Gr1-CD11b), la generación de una condición inflamatoria sistémica asociada al crecimiento tumoral, la producción por células tumorales de factores potencialmente inmunosupresores como IL-10, TGF- β , galectina-1, etc. (4-5).

En los últimos años, se llevaron a cabo intentos para eliminar o atenuar estos mecanismos y, sobre esa base, es decir después de eliminar o atenuar la inmunosupresión, se ha procurado estimular la respuesta inmune utilizando diferentes estrategias de vacunación antitumoral o de transferencia pasiva de inmunidad (4,6).

Por otro lado, respecto de los tumores de origen espontáneo, la dificultad podría ser mucho más profunda. En efecto, a diferencia de muchos tumores

experimentales, la gran mayoría de los tumores surgidos espontáneamente en ratas y ratones, carecen de detectable inmunogenicidad (1,7,8). Esta particularidad podría hacerse extensiva a los cánceres humanos más comunes, sobre la base de que muchos de ellos no aumentan su incidencia en seres humanos que padecen de inmunodeficiencias genéticas o adquiridas (9)

Por otra parte, hay tumores que aun teniendo antígenos, no son inmunogénicos porque, probablemente, generan ese estado de inmunosupresión desde el principio de su crecimiento. Datos nuestros y de otros laboratorios revelan que esa inmunosupresión no se revierte con la extirpación del tumor cuando éste ha superado cierto tamaño crítico, sugiriendo que en estos casos cualquier estrategia de inmunoterapia contra células tumorales residuales que hayan quedado en el organismo después de la extirpación del tumor, muy probablemente esté destinada al fracaso.

El **objetivo general** de este trabajo es determinar si la falta de inmunogenicidad de los tumores espontáneos se debe a la ausencia de antígenos —en cuyo caso todo intento de inmunoterapia sería vano— o a la existencia de mecanismos tolerogénicos que impedirían a esos antígenos iniciar una respuesta inmune de rechazo. Para deslindar entre ambas alternativas utilizaremos como modelos de estudio dos tumores murinos; un linfoma de células T originado espontáneamente en un ratón de la cepa BALB/c de nuestro bioterio, denominado LB y un fibrosarcoma de ratón inducido por el carcinógeno químico metilcolantreno denominado MCC —y la técnica de inmunización con células dendríticas (DC) estimuladas con extracto acelular de tumor.

Para ver la cinética de crecimiento de ambos tumores (MCC y LB) se inocularon doce ratones con 5×10^6 de células tumores por vía subcutánea (s.c) en el flanco derecho. Como se observa en la figura 1A y 1B los tumores difieren en la cinética del crecimiento siendo la sobrevivencia de los ratones portadores ($\bar{x} \pm ES$) de 61 ± 6 días y de 21 ± 1 días respectivamente.

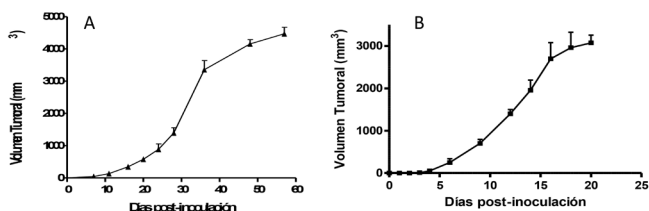


Figura 1: Cinética de crecimiento del tumor MCC (A) y LB (B) en función del tiempo (días).

Luego se pasó a la determinación del cálculo de la Dosis Tumoral 50 (DT50) de ambos tumores. La DT50 es el número de células tumorales que es capaz de crecer en el 50% de los ratones inoculados. Para MCC se determinó que la DT50 fue de $5 \times 10^4 \pm 0.4 \times 10^4$ y las de LB fue de $1 \times 10^3 \pm 0.2 \times 10^3$.

Tanto el fibrosarcoma MCC inducido por metilcolantreno como el linfoma LB, de origen espontáneo, crecen siguiendo una típica curva gompertziana, aunque el crecimiento de LB es más veloz que el de MCC, el tiempo de supervivencia de los ratones es significativamente inferior, al igual que la DT50.

Para evaluar la capacidad inmunizante de ambos tumores, se emplearon dos técnicas de inmunización: Pretratamiento con células tumorales irradiadas y el pretratamiento con células dendríticas estimuladas *in vitro* con extracto acelular de tumor (Figura 2). La eficiencia de los protocolos de vacunación se evaluó mediante la determinación de la DT50 en los animales vacunados y en los controles. Se considera que cuanto mayor es el incremento de la DT50 por arriba de los valores controles (DT50 experimental/ DT50 control), mayor será la resistencia de los animales al tumor, y en consecuencia mayor será la capacidad inmunizante de la vacuna que provocó dicho incremento. Para el ensayo de inmunización con células irradiadas (4), se usaron dos grupos de ratones: un grupo recibió dos dosis s.c. de células tumorales irradiadas (3×10^6) en el flanco izquierdo 14 y 7 días antes de recibir la inoculación con diferentes dosis de células tumorales vivas en el flanco opuesto (Grupo Experimental). El grupo control no fue pre-tratado y recibió las células tumorales vivas en el flanco derecho el mismo día que el grupo experimental. Para el ensayo de inmunización con células dendríticas estimuladas con extracto acelular (4) de MCC o LB (DC+e-MCC o DC+e-LB), se usaron dos grupos de ratones: un grupo experimental y un grupo control. El grupo experimental recibió en la almohadilla plantar, dos dosis de 3×10^5 DC+e-MCC o DC+e-LB 14 y 7 días antes de recibir la inoculación s.c. con células tumorales vivas. Los ratones del grupo control que no fueron pre-tratados o que fueron pretratados con DC sin estimular, recibieron las células tumorales vivas s.c. el mismo día que el grupo experimental.

Los experimentos de este punto demuestran que el tumor espontáneo LB al igual que muchos de los tumores de origen espontáneo descritos en ratas y ratones, carece de detectable inmunogenicidad. Esto quedó evidenciado por la falta de protección contra LB conferida por 2 técnicas conocidas de vacunación. Por otro lado quedó **demostrado que el tumor MCC**, exhibe una fuerte inmunogenicidad.

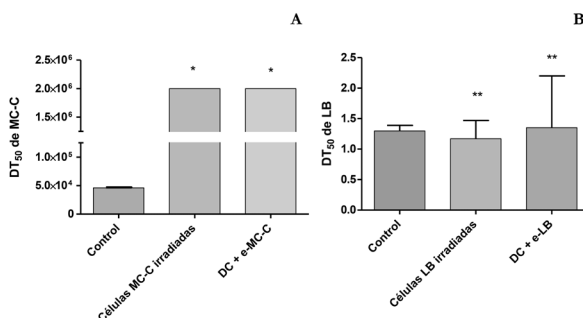


Figura 2: DT50 del tumor MCC (A) y DT50 del tumor LB (B). *p<0,001 vs control.

A continuación quisimos evaluar si la falta de inmunogenicidad del tumor LB tiene relación alguna con la capacidad para promover la maduración de las células dendríticas (DC). Para estudiar esta relación se incubaron DC (1x10

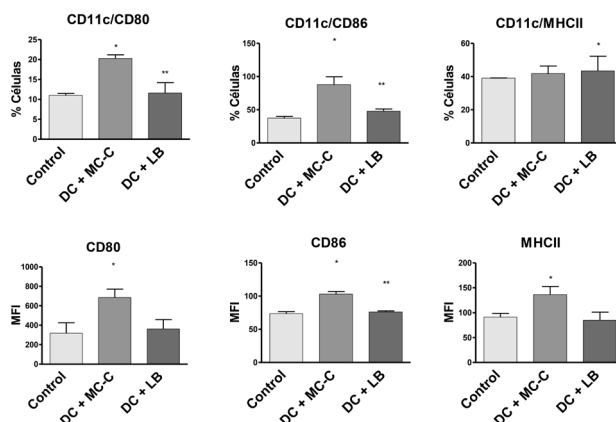


Figura 3: Expresión en superficie de las moléculas co-estimatorias y MHC II en células DC sin estimular (Control) y estimuladas con extracto acelular de tumor MCC (DC + e-MCC) y LB (DC+LB). *p< 0.05; ** p<0.01 respecto del control. Los resultados representan el promedio (media ± error estándar) de 3 experimentos independientes.

Se sabe que durante el proceso de maduración de las DC se produce un aumento de la producción de citoquinas inflamatorias (por ej.: TNF α). Por lo tanto, para verificar que el aumento de los marcadores de maduración se

correlacionaba con un cambio en la actividad biológica de las DC, se evaluó la producción de TNF- α . **Para esto se recolectaron los sobrenadantes de los cultivos de DC sin estimular (control), estimuladas con e-MCC y e-LB** para medir la producción de TNF- α mediante ensayos de ELISA. **Según se observa en la figura 4** la concentración de TNF- α en el sobrenadante de las DC incubadas con e-MCC fue significativamente mayor ($p < 0.01$) que la hallada en el sobrenadante de las DC incubadas con el e-LB y en el sobrenadante de DC sin estimular.

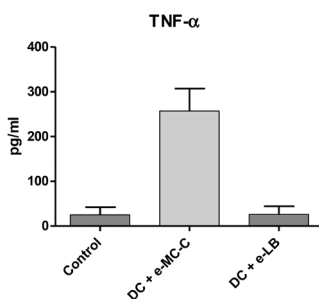


Figura 4: Concentración de TNF- α

Los experimentos demostraron que el extracto acelular del fuertemente inmunogénico tumor MCC promovió la maduración de las DC, mientras que un extracto acelular del tumor LB, de indetectable inmunogenicidad, fue incapaz de hacerlo. Esto permite sugerir que, al menos en parte, la falta de inmunogenicidad del tumor espontáneo LB, estaría asociada con su incapacidad para hacer madurar a las DC, impidiéndoles de ese modo iniciar una respuesta inmune antitumoral.

De esta manera quisimos evaluar si la incapacidad del tumor LB para promover la maduración de las DC se debe a la falta de antígenos tumorales específicos o a que existe una falla en los mecanismos de maduración de las DC, asociados a la incorporación y/o procesamiento de los antígenos tumorales. Si se debiera a la ausencia de antígenos, entonces todo intento de inmunoterapia específica contra el tumor LB sería vano. Si se debiera a una falla en los mecanismos de maduración de las DC, entonces el problema podría, en principio, ser resuelto. En efecto, dado que las DC maduran cuando incorporan antígenos en un contexto de ciertas moléculas o señales madurativas (por ejemplo señales de daño como ser las heat shock proteins), podemos suponer

que la incapacidad del tumor LB para hacer madurar las DC podría deberse a la ausencia de estas señales. En tal caso, estas podrían serles provistas por el tumor MCC, ya que, según, se demostró anteriormente, el e-MCC, es capaz de promover la maduración de las DC. Para demostrar esta alternativa se incubaron DC con una mezcla de los extractos del tumor LB y del tumor MCC y se analizó el nivel de expresión de marcadores de maduración de la DC. En la figura 5 puede observarse que cuando las DC fueron estimuladas con la mezcla de los dos extractos, expresaron marcadores de maduración en un nivel significativamente mayor al observado en DC inmaduras (sin estimular) o en DC incubadas con e-LB. Este aumento en la expresión, sin embargo, fue inferior al observado con DC incubadas con e-MCC.

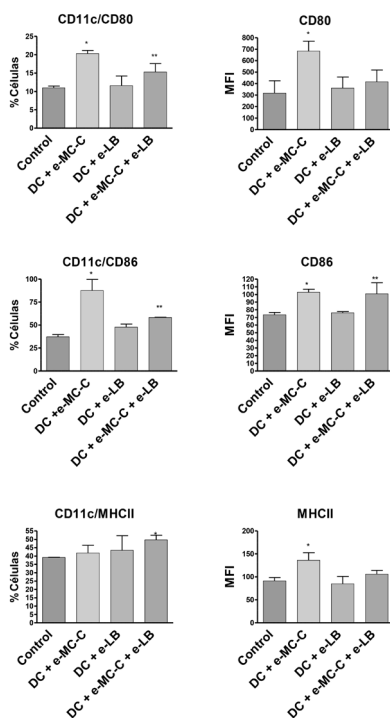


Figura 5: Expresión de los marcadores de maduración CD80, CD86 y MHCII en células dendríticas (DC) sin estimular, estimuladas con extracto de esplenocitos normales (Control), DC+e-MCC, DC+e-LB o con la mezcla de los extractos de ambos tumores (DC+e-MCC DC+e-LB). *p<0,001 - **p<0,05.

La conclusión más plausible de estos experimentos es que el tumor LB tiene antígenos propios, que, cuando son incorporados por las DC en un contexto de señales madurativas provistas por el tumor MCC, promueven la maduración de las DC.

Dado que las DC incubadas con la mezcla de extractos de MCC y LB exhiben marcadores de maduración, nos preguntamos si estas DC son capaces de inmunizar contra LB. Para contestar este interrogante se inocularon ratones con DC+e-MCC+e-LB 14 y 7 días antes del desafío con células tumorales LB vivas. Ratones que recibieron DC + e-MCC +e-LB exhibieron una DT50 para LB significativamente mayor que la de los controles –que no fueron pretratados o recibieron DC inmaduras- y que la de ratones que recibieron DC incubadas con extracto de LB sólo. En la figura 6 se muestran graficados los resultado.

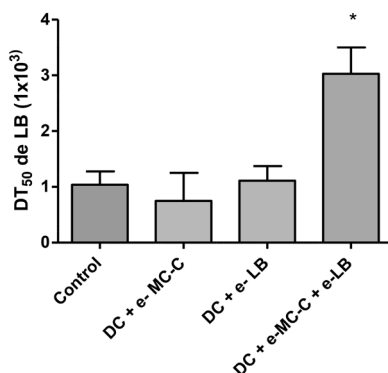


Figura 6: Medición de la Dosis Tumoral 50 (DT50) de LB. * $p < 0,01$ vs. Control y DC + e-LB; $p < 0,05$ vs. DC + e-MCC.

Este punto refuerza la idea que el tumor LB presenta antígenos propios, ya que cuando extractos del tumor LB fueron incorporados por las DC en un contexto de señales madurativas provistas por el tumor inmunogénico MCC, estas DC fueron capaces de inmunizar in vivo contra el tumor LB –reflejado en un aumento significativo de la DT50 respecto de los controles-. Este efecto no puede atribuirse a una supuesta reacción cruzada entre los antígenos de MCC y LB, dado que las DC estimuladas sólo con extractos de MCC no mostraron capacidad vacunante contra LB.

Hasta ahora hemos abordado la principal pregunta planteada en este trabajo, respondiendo que la falta de inmunogenicidad del tumor LB no se debería a la ausencia de antígenos específicos sino a una falla en los mecanismos de maduración de las DC durante el procesamiento de tales antígenos. Hemos visto asimismo que esa carencia de señales madurativas podría ser suplida por el extracto acelular del tumor MCC, de modo tal que la incubación de DC con la mezcla de los extractos de LB y MCC, conseguía hacer madurar a las DC y convertirlas en vacunas preventivas contra LB. Sin embargo, la protección conferida por esta vacuna no fue muy robusta desde que el incremento de la DT50 de LB en vacunados respecto de la DT50 en controles fue sólo de 3, mientras que en el caso de un tumor como el MC-C, una vacuna preventiva aumentó la protección más de 44 veces. Esto puede significar 2 cosas: o el tumor LB tiene antígenos muy débiles (en cuyo caso sería muy difícil utilizar este tipo de vacunas en forma terapéutica contra un tumor establecido) o LB exhibe factores tolerogénicos o inmunosupresores activos que deterioran la expresión de las señales madurativas para las DC. Una indicación de esto último podría ser encontrada en la figura 5. Allí se muestra que, si bien las DC incubadas con la mezcla de extractos MCC+LB, exhiben una mayor expresión de los marcadores de maduración que las DC sin estimular o incubadas sólo con extracto de LB, por otro lado exhiben un nivel menor al observado en DC incubadas con MC-C solo. Por lo tanto, a futuro nos faltaría comprobar que tipo de factores tolerogénicos o mecanismos de inmunosupresión genera el tumor LB, que inhiben activamente la expresión de señales madurativas en las DC. Esto podría ser la razón por la cual el tumor LB se comporta como no inmunogénico y el motivo por el cual extractos del tumor LB son incapaces por sí mismos de promover la maduración de las DC.

Cuando el tenor de estas señales madurativas es muy alto, como parece ocurrir en el extracto del tumor MC-C, fuertemente inmunogénico, los factores tolerogénicos del LB disminuyen pero no alcanzan a anular todos los factores madurativos. En consecuencia, en ese caso la incubación de las DC con la mezcla de extractos de LB y MC-C puede permitir la maduración de las DC y eventualmente inmunizar contra LB. Sin embargo esta maduración de las DC y su consiguiente poder inmunogénico podrían ser fuertemente incrementados si se lograra identificar y eliminar los factores inmunosupresores que exhibe el tumor LB.

Todos los resultados obtenidos hasta el momento con el tumor murino espontáneo LB, no son automáticamente extrapolables a todos los tumores

murinos de origen espontáneo y menos aún a todos los tumores humanos. Sin embargo, nos indican que la falta de inmunogenicidad de un tumor espontáneo no significa necesariamente ausencia de antígenos extraños y por lo tanto nos invitan a creer que, si este fuera el caso para otros tumores murinos y humanos, todavía podría esperarse mucho de las terapias inmunes contra el cáncer. Sin embargo, para que una terapia inmunológica contra este tipo de tumores tuviera la posibilidad de ser eficiente, no bastaría la aplicación de vacunas antitumorales –como se ha intentado sin éxito hasta ahora– sino que se requeriría de un protocolo que añadiera a esas vacunas, diversas señales madurativas complementarias para las células dendríticas - como citoquinas proinflamatorias, *heat shock proteins* – entre otras.

ABSTRACT

Unveiling antigens in a non-immunogenic spontaneous murine tumor using a dendritic cell-based vaccine

Up to date, most attempts to use immunotherapy to cause the regression of animal and human established tumors have not been successful. Former experiments have postulated that this failure could be attributed, at least in part, to a lack of immunogenicity of spontaneous tumors. In this paper, we have investigated whether this lack of immunogenicity can be attributed to the absence of tumor antigens or to the existence of tolerogenic mechanisms preventing such antigens from initiating an antitumor immune response. We have used two murine tumors – a non-immunogenic spontaneous lymphoma (LB) and a strongly immunogenic methylcholanthrene-induced fibrosarcoma (MC-C) – together with a vaccination strategy based on the inoculation of dendritic cells (DC) loaded with a tumor lysate. When DC were pulsed with LB lysate (DC+LB), no maturation of DC was achieved *in vitro* and no protection against LB implants after DC+LB inoculation was observed *in vivo*. On the other hand, when DC were pulsed with MC-C lysate (DC+MC-C), maturation of DC was observed along with a strong protection against MC-C implants after DC+MC-C inoculation. Finally, when DC were pulsed with both LB and MC-C lysates (DC+LB+MC-C), maturation of DC and protection against LB implants were achieved. Since no immune cross reaction between MC-C and LB was ever observed, the most likely interpretation for these results is that LB bears specific tumor antigens but lacks other signals to achieve DC matu-

ration. These signals would be provided by MC-C which would enable DC to mature and to initiate an effective anti-LB immune response.

Key words: spontaneous tumors, dendritic cells, tumor antigens

REFERENCIAS

1. Prehn RT, et al. (1957).
2. Chang MH, et al. (2005).
3. Cranmer LD, et al. (2004)
4. Chiarella P, et al. (2008).
5. Rubinstein N, et al. (2004).
6. Vieweg J, et al. (2007)
7. Middle JG, et al. (1981).
8. Ruggiero RA, et al. (1985).
9. Grulich AE, et al. (2007).

ESTUDIO DE LA MOVILIZACIÓN DE FOSFATIDILSERINA EN LA MEMBRANA DE OVOCITOS FERTILIZADOS Y SU RELEVANCIA PARA LA ACTIVACIÓN DEL DESARROLLO.

Augusto Curia, Matías Gómez Elías, Patricia S. Cuasnicú
y Débora J. Cohen

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET). Vuelta de
Obligado 2490 (1428), Buenos Aires, Argentina.

INTRODUCCIÓN

El fosfolípido fosfatidilserina (PS) se encuentra asimétricamente distribuido en la membrana plasmática, localizándose normalmente en la cara citoplasmática de la bicapa. Su exposición en la cara externa de la bicapa ha sido clásicamente asociada con la apoptosis, actuando como una señal de la célula apoptótica para su posterior fagocitosis. Sin embargo, en los últimos años se ha acumulado evidencia que apoya que la presencia de PS en el compartimiento extracelular de la membrana juega un rol esencial en distintos procesos celulares no asociados a la apoptosis. La distribución de PS en la membrana es establecida por la acción concertada de dos tipos de enzimas en un mecanismo activo dependiente de Ca^{2+} : las flipasas, que activamente mueven PS hacia la cara interna, manteniendo la asimetría, y las escramblasas, que transportan fosfolípidos en ambas direcciones de la bicapa, permitiendo así la exposición de PS.

En todos los mamíferos, la entrada del espermatozoide fertilizante desencadena en el ovocito oscilaciones de Ca^{2+} que inician una serie de cambios denominados en su conjunto "activación". La activación del ovocito incluye eventos tempranos como la exocitosis de gránulos corticales y reinicio de la detenida meiosis, y eventos tardíos como la eliminación del segundo corpúsculo polar, la descondensación de la cabeza del espermatozoide, la formación de pronúcleos y la primera división celular (ver). Si bien ha sido claramente establecido que el Ca^{2+} cumple un papel fundamental en la iniciación de los eventos de activación, es poco lo que se sabe aun sobre cuáles serían los efectores moleculares que traducirían dicho aumento de calcio a los diferentes eventos celulares. En este sentido, recientemente hemos encontrado por primera vez la existencia de una exposición transitoria de PS en el ovocito fertilizado de ratón que no estaría asociada a apoptosis. Los resultados obte-

nidos hasta el momento muestran que PS se expone en ovocitos fertilizados con o sin zona pellucida pero no se observa en ovocitos activados partenogénicamente con ionóforo de calcio. Asimismo, el seguimiento de la marcación para PS expuesta mostró que, en el estadio de cabeza descondensada, la marca se presenta en toda la superficie del ovocito con excepción de la región que recubre el huso meiótico y de la región donde se incorporó el espermatozoide. Luego, en el estadio de dos pronúcleos, la marca para PS expuesta es más tenue y en embriones de dos células, ya no es detectable. Considerando estas evidencias, nuestra hipótesis de trabajo es que *la exposición transitoria de PS que ocurre luego de la fertilización es inducida por el espermatozoide y cumple un rol en la regulación de los eventos asociados a la activación del ovocito*. Para poner a prueba esta hipótesis, nos propusimos caracterizar la exposición de PS en ovocitos fertilizados e identificar las enzimas encargadas de mantener la asimetría de PS en ovocitos.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Animales: Se utilizaron ratones machos adultos (2-5 meses) y hembras (30-120 días) híbridos (C57BL/6xBalb-c)F1. Los animales se mantuvieron a una temperatura de 22-24°C y con alimento y agua ad libitum, con un régimen de 12 hs de luz.

Ensayo de fusión: Los espermatozoides fueron capacitados tal como se describe en . Los ovocitos fueron obtenidos de hembras superovuladas y liberados de las células del cúmulus y de la zona pellucida por tratamiento con hialuronidasa y Tyrode ácido, respectivamente. Los ovocitos fueron inseminados y al cabo de 3 hs, lavados detectándose exposición de PS y ocurrencia de la fusión (ver abajo).

Activación de los ovocitos: Los ovocitos fueron incubados en medio completo con 7% etanol por 5 min o 100 μ M TPEN por 1 h. Alternativamente, fueron incubados en medio libre de Ca con 10 mM SrCl₂ por 1h o 10 μ M ionóforo de Ca A23187 por 5 min. Posteriormente, fueron lavados y colocados en medio fresco por distintos tiempos. En algunos casos, los ovocitos fueron incubados con 50 μ M BAPTA-AM por 20 min previo a la activación con SrCl₂. Al finalizar los distintos tratamientos se detectó exposición de PS y estadio meiótico (ver abajo).

Detección de PS externa: Luego de cada tratamiento, los ovocitos fueron incubados durante 1 h con una dilución 1:20 de Anexina 5 acoplada a FITC (ANX-5-FITC). Al finalizar esta incubación, los ovocitos fueron teñidos con 1 µg/µl Hoechst 33342, lavados, montados y observados al microscopio de fluorescencia o confocal.

Tinción de gránulos corticales: Luego de cada tratamiento los ovocitos fueron fijados por 60 min en 3.7% p-formaldehído, lavados, permeabilizados con 0.1% Triton X-100 en 0.3% BSA-PBS por 15 min y vueltos a lavar. Luego, fueron incubados por 30 min con la aglutinina de *Lens culinaris* acoplado a TRITC, lavados nuevamente, teñidos con Hoechst y montados para su observación.

rt-PCR: El RNA total de los ovocitos fue obtenido usando un “kit” comercial siguiendo las instrucciones del proveedor. El RNA fue retrotranscrito y sometido a PCR usando “primers” específicos para cada una de las enzimas evaluadas, diseñados con el programa “Oligos”. Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa y visualizados por tinción con bromuro de etidio.

RESULTADOS Y DISCUSION

Efecto de la entrada de múltiples espermatozoides sobre la exposición de PS.

Los resultados obtenidos previamente mostraron que a partir de la tercera hora post-inseminación la marcación para PS se pierde en la zona de entrada del espermatozoide, sugiriendo que ésta podría deberse a la internalización o degradación de PS en esa región de la membrana plasmática como consecuencia de la entrada del espermatozoide. Por lo tanto, se analizó la exposición de PS en ovocitos polispermicos para lo cual, los ovocitos fueron inseminados con una alta concentración de espermatozoides, observándose la marcación con ANX-5-FITC (proteína que se une específicamente a PS) a las 3 hs post-inseminación. El número de espermatozoides fertilizantes se determinó por tinción con Hoechst. Observamos que a medida que aumenta la cantidad de espermatozoides que fertilizan al ovocito (desde 2 hasta 5) aumenta el número o la extensión de las regiones negativas en la superficie del ovocito, apoyando la idea de que estas áreas negativas corresponderían a las regiones de entrada de espermatozoides.

Exposición de PS en ovocitos activados partenogenéticamente

La entrada del espermatozoide desencadena la activación del ovocito. Nuestros resultados mostraron que la activación con ionóforo de calcio no fue capaz de inducir la exposición de PS, sugiriendo que sería entonces inducida por el espermatozoide. Por lo tanto, estudiamos la habilidad de otros agentes normalmente utilizados para activar ovocitos, de desencadenar la exposición de PS. Para ello, los ovocitos fueron activados con SrCl o etanol evaluándose la reasunción de la meiosis y la exposición de PS. En paralelo se analizaron ovocitos fertilizados, incubados con ionóforo o no tratados (MII) como controles. Los resultados mostraron que tanto el SrCl como el etanol fueron capaces de inducir la activación del ovocito pero, a diferencia del ionóforo, indujeron también la exposición de PS (Figura 1).

Estos resultados indican que la activación del ovocito por sí misma es capaz de inducir la exposición de PS y que dicha exposición podría ser utilizada como un marcador de las diferencias que existen entre los distintos métodos de activación partenogenética de ovocitos.

Exposición de PS y exocitosis de los gránulos corticales (GC)

Dado que luego de la fertilización, y como parte de la activación del ovocito, ocurre la exocitosis de los GC, existía la posibilidad de que la exposición de PS observada pudiera deberse a dicha exocitosis. Con el fin de evaluar esta posibilidad y aprovechando la diferencia observada entre la activación con ionóforo y los otros métodos, estudiamos la exocitosis cortical en ovocitos activados con ionóforo que, como ya se mencionara, no exponen PS. Para ello, los ovocitos activados con 5mM del ionóforo A23187 fueron fijados, permeabilizados, incubados con la lectina LCA acoplada a rodamina, que se une al contenido cortical y, finalmente, observados en el microscopio confocal. Los resultados mostraron una pérdida masiva del contenido cortical en ovocitos activados con ionóforo similar a la que se observa en ovocitos activados con SrCl.

Estos resultados nos permitieron concluir que la exposición de PS no puede ser atribuida a un desorden de la membrana plasmática provocada por la exocitosis de los gránulos corticales.

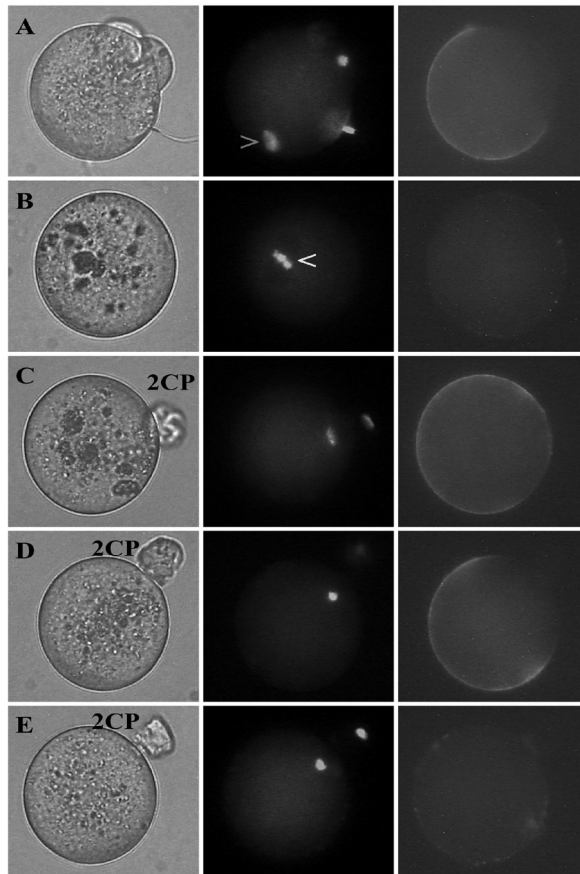


Figura 1: Exposición de PS en ovocitos activados partenogenéticamente. Ovocitos sin ZP fueron inseminados o activados partenogenéticamente mediante tres tratamientos diferentes. **A**, ovocitos fertilizados (control positivo). Se indica con > la cabeza descondensada del espermatozoide fertilizante. **B**, ovocitos no fertilizados (control negativo). Se indica con < los cromosomas en metafase II (MII). **C**, ovocitos Incubados con SrCl 10mM por 1h en medio sin calcio. **D**, ovocitos incubados 5min en 7% etanol. **E**, ovocitos incubados 5min en medio sin calcio conteniendo 5 μ M de ionóforo de calcio (A23187). En C, D y E luego de las distintas incubaciones los ovocitos fueron lavados e incubados 1h en medio completo. En todos los casos se incorporó ANX5 durante la última hora de incubación. Finalmente, los ovocitos fueron teñidos con Hoechst33342 y observados por microscopía de epifluorescencia. Se consideraron activados aquellos ovocitos que presentaron el 2CP al final del tratamiento.

Relevancia del calcio para la exposición de PS

El hecho de que la activación partenogenética de los ovocitos indujera la exposición de PS sugiere que el calcio podría ser importante para dicho fenómeno. Con el fin de determinar el rol que cumple dicho ión en la exposición de PS, los ovocitos fueron incubados con el quelante intracelular de Ca BAPTA-AM previo a la activación con SrCl₂, no observándose activación de los ovocitos ni exposición de PS. Con el fin de evaluar si la falta de exposición de PS se debía en ese caso a la falta de salida de meiosis o a la falta de Ca²⁺, los ovocitos fueron activados con TPEN, un quelante de Zn que induce salida de MII en ausencia de la movilización de Ca²⁺. La mayoría de los ovocitos tratados con TPEN presentaron salida de MII y ausencia de marcación para PS expuesta, apoyando que el aumento de Ca²⁺ citoplasmático sería necesario para dicha exposición. Como otra aproximación se estudió la exposición de PS en ovocitos provenientes de hembras deficientes para CaMKII gamma (CaMKII γ), los cuales presentan oscilaciones de calcio normales pero arresto en MII. En concordancia con los resultados anteriores los ovocitos CaMKII γ activados con SrCl₂ presentaron fluorescencia para ANX-5-FITC, similar a la observada en ovocitos "wild type".

Estos resultados indican que la exposición de PS requiere el aumento de Ca²⁺ intracelular que ocurre en el ovocito activado.

Identificación de las enzimas encargadas de mantener la asimetría de PS en ovocitos

Las "scramblasas" y "flipasas" son las enzimas encargadas de la translocación de los distintos tipos de fosfolípidos desde y hacia las dos caras de la bicapa. En ratón, se han descrito cuatro tipos distintos de "scramblasas" (PLSCR1 a 4) y dos de "flipasas" (ATP8a1 y 2). Con el fin de identificar cuáles de ellas están presentes en el ovocito, realizamos rt-PCR utilizando RNA aislado de ovocitos como molde y "primers" específicos para las enzimas ya descritas. Como control positivo, se utilizó en cada caso RNA obtenido del tejido en el cual la expresión de la enzima evaluada fue previamente reportada. Los resultados mostraron que mientras no se detectaron bandas para ATP8A2 y PLSCR2, se amplificaron bandas del tamaño esperado para ATP8A1, PLSCR1 y 3 (Figura 2). La identidad de estas bandas fue confirmada por secuenciación. La presencia de estas bandas no puede ser atribuida a una contaminación de los ovocitos con células del cúmulus ya que en las muestras analizadas no se detectó la expresión de CD52, un gen específico de cúmulos.

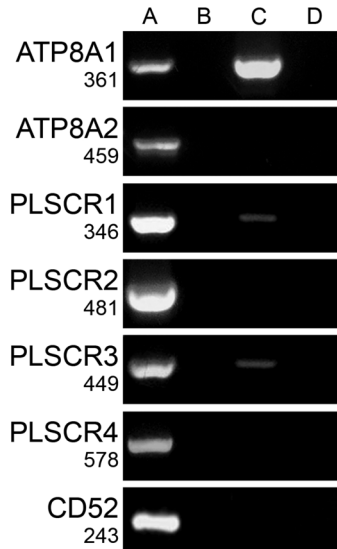


Figura 2: Análisis de expresión de flipasas y scramblasas en ovocitos por RT-PCR. Se indica el nombre de cada gen amplificado a la izquierda y debajo el tamaño de cada fragmento amplificado en pares de bases. **A:** cDNAs usados como control positivo en cada reacción, para ATP8A1 testículo, ATP8A2 epidídimo, PLSCR1 hígado, PLSCR2, riñón, PLSCR3 pulmón, PLSCR4 riñón. CD52 control de contaminación por células del cúmulo. **B:** Control de PCR usando agua como molde. **C:** cDNA de ovocito **D:** Control de retrotranscripción omitiendo la enzima retrotranscriptasa en la reacción.

Estos resultados indican que las enzimas responsables de la movilización de PS se expresan en el ovocito de ratón.

La movilización de PS en ovocitos fertilizados/activados podría ser simplemente una consecuencia del aumento de Ca intracelular que ocurre durante la fertilización. Sin embargo, la aparición de PS en la cara externa de la bicapa podría estar involucrada en el establecimiento del bloqueo de polispermia a nivel de la membrana plasmática. Dado que se trata de una molécula negativamente cargada, su exposición podría prevenir la unión de espermatozoides supernumerarios. Alternativamente, en su localización interna PS podría actuar como un “ancla” para proteínas que contuvieran el dominio de unión a PS, denominado C2 y, por lo tanto, regular actividad de dichas proteínas a través de la modulación de su localización subcelular y

disponibilidad. En este sentido, varias proteínas postuladas como involucradas en el proceso de activación poseen dominio C2. Por ejemplo, la proteína específica de espermatozoide PLC ζ , responsable de disparar las oscilaciones de Ca luego de la fertilización. Asimismo, las PKC convencionales y noveles también poseen dominio C2 y su translocación a la membrana plasmática requiere dicho dominio. Es posible, entonces que la movilización de PS en el ovocito regule la actividad de PLC ζ y/o PKCs durante la activación. En resumen, nuestros resultados muestran por primera vez la existencia de una exposición transitoria en el ovocito fertilizado que no está asociada a apoptosis y que estaría inducida por el aumento de Ca que se produce durante la activación. La relevancia funcional de esta exposición transitoria de PS para la activación del ovocito se encuentra en estudio en nuestro laboratorio.

REFERENCIAS

1. Fadok et al., J.Immunol. 148,2207-2216 (1992).
2. Sahu et al., Arch.Biochem.Biophys. 462,103-114 (2007)
3. Malcuit y Fissore, Adv.Exp.Med.Biol. 591,117-131 (2007).
4. Raz y Shalgi, Hum.Reprod. 13,133-145 (1998).
5. Curia et al., Biocell, 34, 91 (2010).
6. Cohen et al., (2000). Biol.Reprod. 63, 462-468.
7. Yanagimachi, en *The Physiology of Reproduction.*, Knobil & Neill, Eds. (Raven Press, New York, 1994), cap.
8. Suzuki et al., Development 137,2659-2669 (2010).
9. Backs et al., PNAS 107,81-86 (2010).
10. Hasegawa et al., Am J Reprod Immunol 60,187-191 (2008).
11. Yeung et al., J Cell Biol 185,917-928 (2009).
12. Fairn y Grinstein, Science 320,458-460 (2008).
13. Saunders et al., Development 129,3533-3544 (2002).
14. Swann et al., Semin Cell Dev Biol 17,264-273 (2006).
15. Ito et al., Mol Reprod Dev 78,846-853 (2011).
16. Halet. Biochim Biophys Acta 1742,185-189 (2004).
17. Baluch et al., Dev Biol 274,45-55 (2004).

MECANISMOS DEL DOLOR NEUROPÁTICO Y SU MODULACIÓN POR HORMONAS SEXUALES ENDÓGENAS. POSIBLES APLICACIONES TERAPÉUTICAS.

María Florencia Coronel

Instituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El dolor neuropático es un dolor crónico que se produce como consecuencia de una lesión o enfermedad del sistema nervioso, ya sea periférico o central . Los pacientes con dolor neuropático manifiestan diversas alteraciones del sensorio siendo la alodinia, dolor producido por estímulos normalmente no dolorosos, una de las más frecuentes y acuciantes . El paciente con dolor persistente manifiesta un deterioro progresivo de su salud general y calidad de vida, con una variada sintomatología que incluye depresión severa y disturbios del sueño, el apetito y la memoria .

La incidencia del dolor crónico se encuentra en franco aumento y se calcula que en Argentina afecta a 1.8 millones de personas. A pesar de los múltiples avances recientes, el dolor crónico sigue siendo refractario a los tratamientos farmacológicos disponibles, lo que motiva la necesidad de estudios dirigidos a entender los mecanismos involucrados, con el fin de orientar el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

Si bien la generación y el mantenimiento del dolor crónico involucran varios mecanismos, la hiperexcitabilidad de las neuronas del asta dorsal de la médula espinal constituye un factor clave . Sin embargo, las neuronas no son las únicas células involucradas. En los últimos años se ha reconocido el papel crítico de las células gliales activadas como participantes indispensables en estos procesos, capaces de producir y liberar factores proalgésicos que pueden alterar la actividad neuronal y por lo tanto la generación y/o el mantenimiento del dolor. Una de nuestras hipótesis es que este proceso de activación glial podría ser modulado por esteroides neuroactivos, abriendo la posibilidad de una nueva perspectiva terapéutica.

De ahí que en este proyecto nos propusiéramos **evaluar los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la generación y el man-**

tenimiento del dolor neuropático a nivel del asta dorsal de la médula espinal, sitio clave del procesamiento nociceptivo, y **estudiar los efectos de la administración de progesterona**, neuroesteroide con probada acción neuroprotectora, **en animales con dolor crónico**.

En particular nos centramos en evaluar el proceso de activación glial y la expresión y actividad de las enzimas proinflamatorias ciclooxigenasa 2 (COX-2) y la isoforma inducible de la sintasa del óxido nítrico (iNOS), en animales con dolor neuropático. Ambas enzimas y sus metabolitos favorecen el estado de hiperexcitabilidad de los circuitos nociceptivos espinales involucrados en la generación y el mantenimiento del dolor neuropático, y constituyen blancos terapéuticos claves.

Por otra parte, en este proyecto buscamos esclarecer el valor de la progesterona como posible agente terapéutico y modulador del dolor crónico. Nuestro grupo ha demostrado recientemente que la administración de progesterona a animales con compresión del nervio ciático o injuria de la médula espinal logra prevenir el desarrollo de alodinia mecánica y térmica, y modula la expresión de moléculas relevantes para el procesamiento nociceptivo a nivel espinal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Protocolos con animales de experimentación: Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética Institucional del IBYME (Resolución CE 007-1/2013 del 13/06/13) y el Comité Institucional para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina (Res. 1517 del 23/8/2010).

Lesión de la médula espinal: Ratas macho adultas de la cepa Sprague-Dawley (200 g) fueron anestesiadas y sometidas a una hemisección de su médula espinal a nivel T13 según procedimientos previamente publicados. En animales controles se realizó una operación "sham" o simulada, en la que la médula se expuso sin realizar la lesión.

Administración de drogas: Los animales fueron tratados con dosis diarias de progesterona (16 mg/kg, Sigma P8783) o vehículo (aceite de ricino) por vía subcutánea, comenzando inmediatamente después de inducida la lesión, y hasta el momento del sacrificio (día 1 o 28 post injuria).

Conducta nociceptiva: Tests funcionales. Los estímulos mecánicos y térmicos utilizados en estos tests no generan dolor en animales controles y permiten detectar el desarrollo de alodinia (dolor frente a estímulos no dolorosos) en animales con injuria espinal.

Alodinia mecánica: Los filamentos de von Frey (1-26 g) se aplicaron sobre la superficie plantar de las patas traseras de cada animal, tal como hemos descrito previamente . La retirada brusca de la pata acompañada por lamido, vocalización, ataque al estímulo o intento de escape (respuestas supraspinales), se consideró como respuesta positiva. Se determinó el umbral de respuesta en base al filamento de menor gramaje que indujera una respuesta positiva en al menos dos de las tres aplicaciones realizadas. Se consideró respuesta en rango alodínico a aquella obtenida con filamentos de 6 g o menos.

Alodinia térmica al frío: Como ya hemos descrito , para determinar la alodinia térmica al frío se procedió según el método de Choi estimulando las patas traseras del animal con una gota de acetona. El estímulo se repitió 5 veces, con intervalos de 5 minutos. Se consideró como respuesta positiva la retirada brusca de la pata del animal, acompañada por respuestas supraespinales. Las respuestas dolorosas se expresaron como un punto, siendo la frecuencia de retirada máxima 5 y la mínima 0.

Disección de la médula espinal: Los animales fueron sacrificados a diferentes tiempos post-lesión (día 1 o 28) y se disecó la médula espinal lumbar, siguiendo procedimientos descritos en publicaciones previas .

TÉCNICAS EMPLEADAS:

- **RT-PCR en tiempo real:** Se emplearon técnicas descritas en nuestros trabajos previos para analizar la expresión relativa de los ARNm de las enzimas proinflamatorias COX-2 e iNOS y del inhibidor I κ B α , utilizando el gen de la ciclofilina como standard interno. La expresión relativa de los mensajeros se expresó como porcentaje de inducción con respecto a animales controles.
- **Actividad enzimática de COX-2:** Se utilizó un kit comercial (COX Activity Assay Kit, Cayman Chemicals), siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante.
- **Actividad enzimática de iNOS:** A fin de analizar la actividad enzimática

de iNOS se procedió a cuantificar los productos estables de la oxidación del óxido nítrico (NO), nitritos y nitratos (NOx), utilizando un kit comercial (Griess Reagent System, Promega), siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante.

- **Immunohistoquímica:** En secciones de la médula espinal se estudió la expresión de GFAP (marcador de astrocitos) y OX-42 (marcador de microglia), utilizando anticuerpos específicos. Por medio de un analizador de imágenes Optimas Bioscan, se determinó el número de células inmunoreactivas por unidad de área.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los animales con injuria espinal se observó una disminución del umbral de respuesta frente a la estimulación mecánica y térmica en ambas patas traseras (ipsi y contralaterales a la lesión), con detección de niveles alodínicos a partir del día 14 de inducida la injuria (Fig. 1). Interesantemente, la administración de progesterona previno el desarrollo de alodinia mecánica y térmica fría. Los animales controles, sometidos a operación “sham” e inyectados con vehículo, mantuvieron umbrales de respuesta normales (Fig. 1).

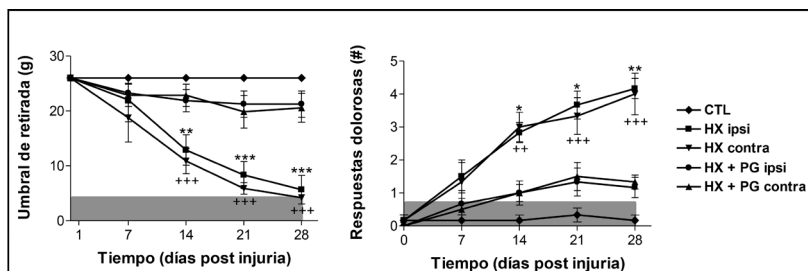


Figura 1: Conducta nociceptiva de animales controles (CTL), con hemisección de su médula espinal (HX) o hemisección y tratamiento con progesterona (HX+PG). Se muestra el umbral de retirada frente a estímulos mecánicos (Test de von Frey) y el número de respuestas dolorosas frente a estímulos fríos (Test de Choi) de ambas patas traseras (ipsi y contralaterales a la lesión).

Los valores corresponden a la media $\pm$ SEM y fueron analizados utilizando el Método de Friedman para Análisis de Varianza y un post test de comparación múltiple. Sólo se detallan las diferencias estadísticamente significativas utilizando los siguientes símbolos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ para comparar HX vs HX+PG, y $p < 0,05$; $p < 0,01$ y $p < 0,001$ para comparar HX o HX+PG vs CTL.

Al analizar mediante inmunohistoquímica la expresión de GFAP, marcador de astrocitos, y OX-42, marcador de células de la microglía, observamos un incremento significativo en el número de células gliales presentes en el asta dorsal de animales con injuria espinal, tanto en el período agudo (1 día) como en el período crónico (28 días) post injuria, y recuentos significativamente menores en animales lesionados que recibieron progesterona (Fig. 2).

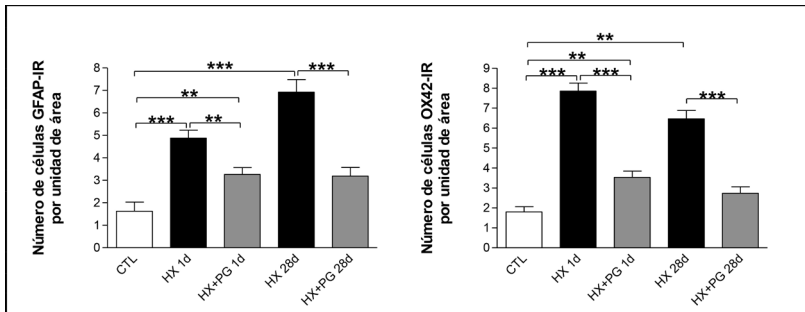


Figura 2: Número de células GFAP y OX-42 inmunoreactivas por unidad de área en el asta dorsal de la médula de animales controles (CTL), con hemisección espinal (HX) o hemisección y tratamiento con progesterona (HX+PG), en el período agudo (día 1) o crónico (día 28) luego de producida la injuria.

Los valores que se muestran corresponden a la media $\pm$ SEM y fueron analizados utilizando ANOVA de dos vías. Las diferencias estadísticamente significativas se representan utilizando los siguientes símbolos: ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$.

Al analizar la expresión de los ARNm de COX-2 e iNOS mediante ensayos de RT-PCR en tiempo real, observamos que la injuria espinal desencadenó un incremento significativo en los niveles de expresión de ambas enzimas en el asta dorsal de la médula, en el período agudo (día 1) luego de inducida la lesión (Fig. 3). En el largo plazo (28 días) los niveles de expresión de COX-2 e iNOS fueron similares a los detectados en animales controles (Fig. 3). Por otra parte, en los animales que recibieron progesterona los niveles de los ARNm de ambas enzimas mantuvieron valores basales, similares a los detectados en animales controles, tanto en el período agudo como en el período crónico post lesión (Fig. 3).

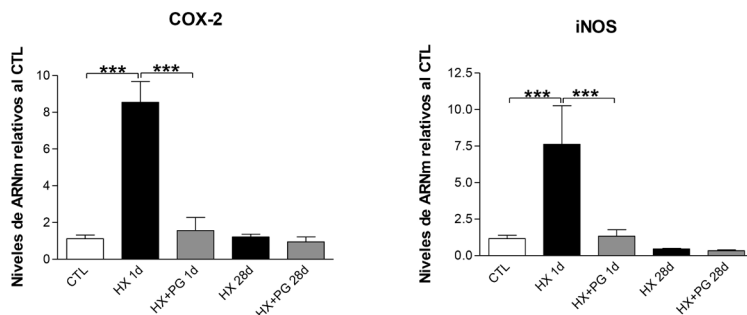


Figura 3: Niveles de los ARNm de COX-2 e iNOS en animales controles (CTL), con hemisección de su médula espinal (HX) o hemisección y tratamiento con progesterona (HX+PG), en el período agudo (día 1) o crónico (día 28) luego de producida la injuria. Los valores que se muestran corresponden a la media $\pm$ SEM y fueron analizados utilizando ANOVA de dos vías. Las diferencias estadísticamente significativas se detallan utilizando los siguientes símbolos: *** $p < 0.001$.

A fin de evaluar si los niveles de expresión de COX-2 e iNOS correlacionaban con el grado de actividad enzimática, se analizó la actividad de ambas enzimas utilizando kits comerciales. Observamos que efectivamente la actividad de ambas enzimas se encontraba aumentada en el período agudo luego de la injuria en animales hemiseccionados, mientras que se mantenía en niveles basales en animales tratados con el esteroide (Fig. 4).

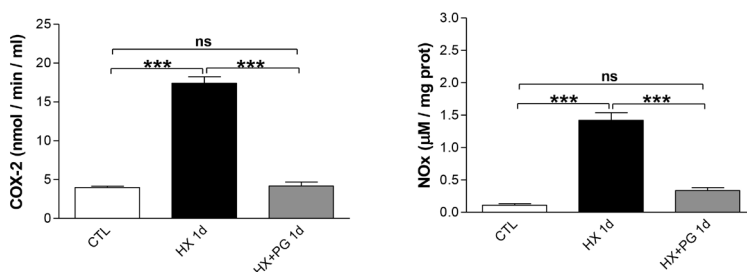


Figura 4: Actividad enzimática de COX-2 y niveles de nitritos y nitratos (NOx) detectados en el asta dorsal de la médula espinal de animales controles (CTL), con hemisección espinal (HX) o hemisección y tratamiento con progesterona (HX+PG), en el período agudo (día 1) luego de producida la lesión. Los valores corresponden a la media $\pm$ SEM y fueron analizados utilizando ANOVA de una vía: *** $p < 0.001$; ns $p > 0.05$.

A fin de evaluar si los menores niveles de expresión de COX-2 e iNOS detectados luego de la administración del esteroide involucraban al factor de transcripción NF κ B, analizamos la expresión de I κ B α , como un indicador del grado de transactivación de NF κ B (NF κ B induce la transcripción de I κ B α , quién a su vez actúa como inhibidor de NF κ B).

NF κ B es un factor de transcripción que regula la expresión de iNOS y COX-2. Por otra parte, la progesterona es un importante modulador de la actividad del NF κ B. Por lo que sería factible suponer que los menores niveles de expresión de las enzimas proinflamatorias detectados en animales que recibieron el esteroide podrían obedecer a una menor actividad del NF κ B en presencia de progesterona.

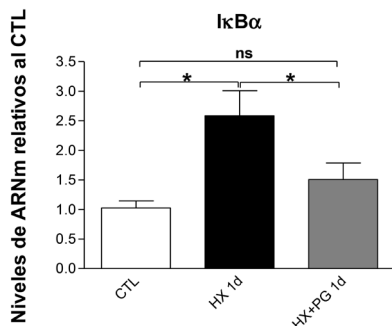


Figura 5: Niveles de los ARNm correspondientes a I κ B α detectados en la médula espinal dorsal de animales controles (CTL), con hemisección de su médula espinal (HX) o hemisección y tratamiento con progesterona (HX+PG), 1 día después de inducida la lesión espinal. Los valores que se muestran en el gráfico corresponden a la media $\pm$ SEM y fueron analizados utilizando ANOVA de una vía. Las diferencias estadísticamente significativas se detallan utilizando los siguientes símbolos: * $p < 0.05$; ns $p > 0.05$.

Los resultados obtenidos (Fig. 5) muestran que en animales que reciben progesterona los niveles de expresión de I κ B α se encuentran disminuidos, sugiriendo un menor potencial de transactivación de NF κ B en presencia del esteroide, lo cual correlaciona con menores niveles de expresión de iNOS y COX-2. A su vez, los menores niveles de expresión y actividad de las enzimas proinflamatorias correlaciona con los comportamientos no alodínicos detectados en estos animales.

En resumen, los resultados muestran una fuerte respuesta glial a la lesión espinal, con un aumento en la expresión y actividad de enzimas proinflamato-

rias cuyos metabolitos contribuyen a activar los circuitos espinales de dolor. La administración de progesterona atenúa la activación glial y la producción de mediadores proalgésicos, logrando mitigar el dolor crónico. En cuanto a los mecanismos involucrados, los resultados obtenidos sumados a experimentos aún en marcha sugieren la participación del factor de transcripción NF κ B, cuya transactivación se encuentra disminuida en los animales tratados con progesterona.

Consideramos que estos estudios han aportado un mejor conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la generación y/o el mantenimiento del dolor crónico, y esperamos que estos conocimientos favorezcan el diseño de nuevos abordajes terapéuticos y permitan mejorar la salud y calidad de vida de los pacientes con dolor neuropático.

ABSTRACT

Progesterone reduces neuropathic pain-associated behaviors and prevents spinal cord injury-induced increase in COX-2 and iNOS expression.

Chronic pain develops in nearly 70% of patients with spinal cord injury (SCI) with a significant impact on functioning, mood and life satisfaction. Unfortunately, currently available pharmacotherapy has limited efficacy and adverse side effects. Progesterone, a neuroprotective steroid, may offer a promising perspective in neuropathic pain modulation.

Although multiple mechanisms may contribute to the development of chronic pain, the activation of spinal glial cells and the subsequent release of several mediators, play a central role. In particular, prostaglandins and NO, mainly released by cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS), are key players in the neuroinflammatory reaction activated after SCI.

In this study, we evaluated the development of pain-associated behaviors in animals subjected to a spinal cord lesion and receiving either progesterone or vehicle. By using biochemical, immunohistochemical and molecular techniques, we investigated the impact of progesterone administration on the expression and activity of spinal COX-2 and iNOS after SCI, as well as the profile of glial cell activation. Since this inflammatory response involves the activation of the transcription factor nuclear factor- κ B (NF- κ B), we also explored the mRNA levels of the inhibitory protein I κ B- α , as an index of NF- κ B transactivation.

Animals subjected to SCI developed both mechanical and thermal allodynia in their hindpaws. Interestingly, animals receiving progesterone did not display allodynic behaviors. Injured animals receiving the steroid presented reduced mRNA levels of the proinflammatory enzymes, as well as decreased COX-2 activity and nitrite levels, as compared to vehicle-treated injured rats. Further, animals receiving progesterone exhibited lower levels of I κ B- α mRNA, suggesting decreased NF- κ B transactivation. Progesterone administration also attenuated the injury-induced increase in the number of astrocytes and microglial cells detected in the dorsal horn.

Our results suggest that progesterone, by modulating early neuroinflammatory events triggered after SCI, may represent a useful strategy to prevent the development of central chronic pain.

REFERENCIAS

- Basbaum, Bautista, Scherrer and Julius. *Cellular and molecular mechanisms of pain*. Cell 2009, 139:267-284.
- Coronel, Labombarda, Roig, Villar, De Nicola and González. *Progesterone prevents nerve injury-induced allodynia and spinal NMDA receptor upregulation in rats*. Pain Med 2011, 12:1249-1261.
- Coronel, Labombarda, Villar, De Nicola and González. *Progesterone prevents allodynia after experimental spinal cord injury*. J Pain 2011, 12:71-83.
- Gao and Ji. *Chemokines, neuronal-glial interactions, and central processing of neuropathic pain*. Pharmacol Ther 2010, 126:56-68.
- Labombarda, Coronel, Villar, De Nicola and Gonzalez. *Neuropathic pain and temporal expression of preprodynorphin, protein kinase C and N-methyl-D-aspartate receptor subunits after spinal cord injury*. Neurosci Lett 2008, 447:115-119.
- Little, Doyle and Salvemini. *Reactive nitroxidative species and nociceptive processing: determining the roles for nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in pain*. Amino Acids 2012, 42:75-94.
- Mika, Zychowska, Popielek-Barczyk, Rojewska and Przewlocka. *Importance of glial activation in neuropathic pain*. Eur J Pharmacol (in press) 2013.
- Nicholson and Verma. *Comorbidities in chronic neuropathic pain*. Pain Medicine 2004, 5:S9-S27.
- Vanegas and Schaible. *Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord*. Prog Neurobiol 2001, 64:327-363.

IMPLICANCIAS DEL GEN FMR1 EN LA FISIOPATOLOGÍA DEL OVARIO

Dra. Liliana Dain y Dra. Ianina Ferder.

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)

INTRODUCCIÓN

El gen *FMR1* es el responsable del Síndrome de Fragilidad del X (SFX), se localiza en el sitio FRAXA en el brazo largo del cromosoma X (Xq27.3). En su región 5' no codificante presenta una zona de tripletes CGG que puede variar en longitud. Según el tamaño de la expansión, los alelos se clasifican en normales (5-44 repeticiones), intermedios (45-54 repeticiones), premutados (55-200 repeticiones) o con mutación completa (>200 repeticiones). Mientras que la mutación completa es la causante del SFX, el estado de premutación se asocia a otros 2 desórdenes clínicos: Síndrome de temblor/ataxia asociado a la Fragilidad del X (FXTAS), un desorden neurodegenerativo de inicio tardío y a la Insuficiencia Ovárica Primaria (IOP) asociada a la Fragilidad del X (FXPOI).

Referida comúnmente como Falla Ovárica Prematura, la IOP se define como amenorrea antes de los 40 años, aumento en los niveles séricos de FSH (a niveles menopáusicos) y bajos niveles de estradiol (hipoestrogenismo) con distintos grados de atresia folicular. Tiene una incidencia del 1% en mujeres menores de 40 años y del 0,1% en menores de 30. FXPOI es la causa genética conocida más común de la IOP 46, XX y la premutación en *FMR1* es responsable del 4-6% de todos los casos de IOP 46, XX. Aproximadamente el 2% de las mujeres 46, XX con IOP aislada y el 14% de las mujeres 46, XX con IOP familiar son portadoras de la premutación en el gen *FMR1*. Asimismo, se ha descrito que alrededor del 20% de las mujeres portadoras de la premutación desarrollan IOP, mientras que la prevalencia de la premutación en controles se estima entre 1/100 y 1/300.

Si bien no se conoce el mecanismo por el cual la premutación del gen *FMR-1* puede causar la disfunción ovárica y la IOP, se postuló que puede ocurrir una disminución inicial del número de folículos o una velocidad acelerada de la atresia. Se sabe que la proteína que codifica este gen, FMRP (Fragile X mental retardation protein), se expresa en altas cantidades en célu-

las germinales del ovario fetal . Asimismo, se ha descrito que esta proteína actúa como inhibidor de la traducción de otros ARN mensajeros, formando parte de los procesos de silenciamiento génicos mediados por miRNAs .

Teniendo en cuenta su función, se ha postulado como posible hipótesis de la patogenia, que un aumento de FMRP en estadios tempranos del desarrollo de los ovocitos podría conducir a una haploinsuficiencia de proteínas involucradas en este proceso, provocando una disminución del *pool* inicial de folículos. Sin embargo, y dado que en FXTAS se ha observado un aumento del ARN mensajero del gen como consecuencia de la premutación , se postula como mecanismos alternativo la existencia de un aumento del ARN mensajero en el ovario que ejerza un efecto tóxico en el tiempo, con el consecuente incremento de la atresia folicular. 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.

Considerando la escasa información que existe acerca de *FMR1* y su expresión en ovario, en trabajos previos analizamos la expresión de la proteína FMRP y su mensajero a lo largo de la foliculogénesis en un modelo de rata . Detectamos que FMRP se expresaba a lo largo de todo el desarrollo folicular y que la misma aumentaba a medida que el folículo se desarrollaba. El patrón de expresión del ARN mensajero, por su parte, fue el opuesto al que se obtuvo para la proteína, ya que se observó menor expresión en los folículos más desarrollados. Estos resultados sugerirían que la expresión del mensajero y su proteína en el ovario estarían regulados de manera diferente y posiblemente independiente.

OBJETIVOS

A partir de los antecedentes mencionados, para este trabajo nos propusimos analizar si la expresión del ARN mensajero (ARNm) y de la proteína se regularía por la FSH, la hormona trófica por excelencia del ovario. Asimismo, iniciamos los estudios para determinar los efectos patológico que ejercería la premutación en células ováricas en cultivo.

Metodología y Resultados:

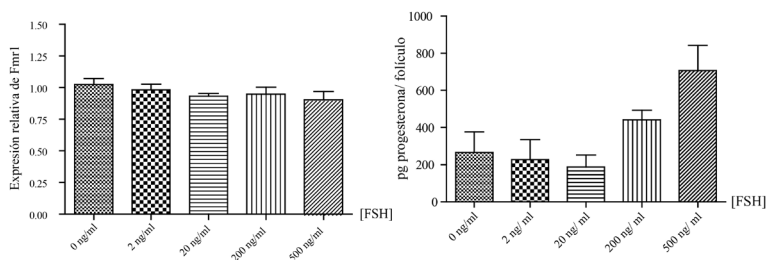
Para la primer parte del trabajo, se utilizaron ratas prepuberales de 21-23 días tratadas durante 3 días con dietilestilbestrol (DES) para enriquecer a los ovarios en folículos antrales tempranos. Pasado ese tiempo, las

ratas se sacrificaron y se aislaron folículos antrales tempranos bajo lupa estereoscópica que se incubaron durante 24 horas en medio de cultivo libre de suero en presencia de cantidades crecientes de FSH.

Para el estudio de la expresión del mensajero, el ARN se extrajo por trizol y la expresión de *Fmr1* se midió por retrotranscripción y PCR en tiempo Real (RT-qPCR). Para los ensayos de la expresión de FMRP, se realizó un lisado celular que se sometió a ultracentrifugación para enriquecer el extracto en la fracción ribosomal y la presencia de la proteína se analizó por Western –Blot (WB).

La Figura 1 muestra los resultados obtenidos al ensayar la expresión del ARNm con diferentes cantidades de FSH. Como se observa, no se halló diferencias en los niveles de expresión de *Fmr1*. Como control de la acción de FSH, se midió la producción de progesterona (P) por Radioinmunoensayo (RIA) en los medios condicionados de los folículos en cultivo. Como se esperaba, la producción de P aumenta a medida que aumenta la concentración de FSH.

Figura 1: Estimaciones cuantitativas de los niveles del ARNm de *Fmr1* (A) y de Progesterona (B) en Folículos Antrales Tempranos



A: Los valores la expresión de *Fmr1* se relativizaron a en condiciones basales (0 ng/ml). Las barras representan la media $\pm$ SEM de 2 experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado. $p > 0,05$ (Test de Kruskal- Wallis). **B:** Los niveles de progesterona se midieron en el medio condicionado por RIA. Los valores se expresaron como pg de progesterona/folículo. Las barras representan la media $\pm$ SEM de 2 experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado.

La Figura 2 muestra los resultados del ensayo de expresión de FMRP. Como se observa, los resultados son similares a los hallados para el ARN.

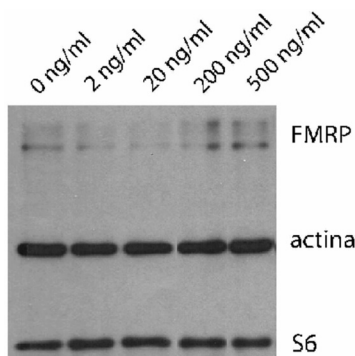
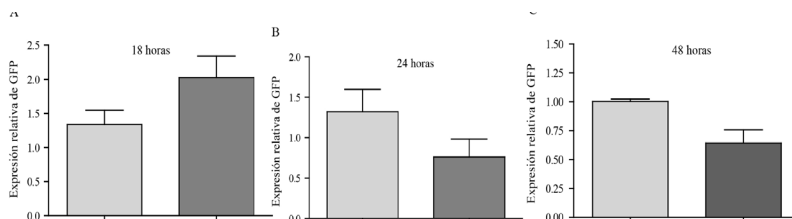


Figura 2: WB representativo de la expresión de FMRP en extractos proteicos provenientes de folículos cultivados con diferentes concentraciones de FSH. Los valores en ng/ml indican la concentración de FSH agregada al medio. Se estudió la expresión de FMRP, la de actina como control de carga y la de S6 como control de expresión de una proteína ribosomal.

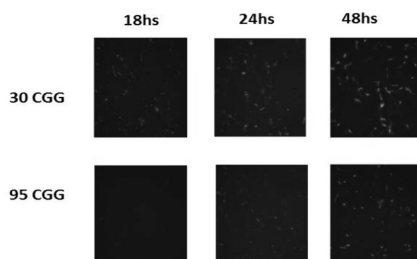
El segundo aspecto que quisimos abordar en nuestro estudio fue el efecto biológico de la introducción de tripletes en el rango de la premutación en una línea celular de células de granulosa humana (KGN). Para tal fin se transfectaron las células con un plásmido conteniendo tripletes en el rango normal o de la premutación, río arriba de un gen reportero (GFP). Luego de 18, 24 y 48 horas de transfección, se observó la fluorescencia emitida dentro las células mediante microscopía y se midieron los niveles de ARNm del gen reportero mediante RT-qPCR.

Como se observa en la Figura 3, existiría una tendencia hacia un aumento en los niveles del mensajero de GFP con 95 repeticiones luego de las 18 hs de transfección. A las 24 y 48hs esta tendencia se revirtió. En todos los casos, las diferencias no alcanzaron significancia estadística.

Asimismo, detectamos una menor cantidad de células que expresan la proteína GFP, en presencia del plásmido con la premutación en todos los tiempos de transfección estudiados, como se observa en la Figura 4.

Figura 3. Estimaciones cuantitativas de los niveles del ARNm de *GFP* en células KGN

Se transfectaron células KGN con plásmidos que contienen 30 o 95 tripletes CGG río arriba del gen reportero *GFP*. Se midieron los niveles de expresión del ARNm de *GFP* a las 18 (A), 24 (B) y 48 (C) horas de transfección por RT- qPCR. En todos los casos los valores se relativizaron a la expresión de β - gal que se co-transfectó en paralelo y se compararon con los niveles de ARNm presentes en células transfectadas con 30 tripletes CGG. Las barras representan la media $\pm$ SEM de 3 experimentos. $p > 0,05$ (Test de Mann- Whitney).

Figura 4: Expresión de *GFP* en células KGN en cultivo.

Se transfectaron células KGN con los plásmidos conteniendo 30 o 95 tripletes CGG durante 18, 24 y 48 horas. Pasado este tiempo, las células se observaron al microscopio de fluorescencia.

DISCUSIÓN

En los últimos años se describió que el estado de premutación en el gen *FMR1* está asociado al Síndrome de temblor/ ataxia asociado a la Fragilidad del X, FXTAS, un desorden neurodegenerativo de inicio tardío y a la Insufi-

ciencia Ovárica Primaria asociada a la Fragilidad del X, FXPOI. Sin embargo, y a pesar de las numerosas evidencias que existen acerca de la asociación del estado de premutación del gen con la FXPOI, la expresión y función de *FMR1* a lo largo del desarrollo folicular ha sido escasamente estudiado, más aun considerando que el gen se transcribe y traduce en muchos tejidos, incluyendo el ovario.

Actualmente se propone que la FXPOI se produciría por un efecto tóxico derivado de la expresión aumentada del ARNm como consecuencia de la presencia de la premutación y no por una disminución en los niveles de la proteína. Sin embargo, este mecanismo se postula por analogía a los estudios realizados en FXTAS y no se conoce si un aumento del ARNm es también responsable de la patología ovárica. Por otro lado, hasta la fecha, no existen estudios en los que se hayan evaluado los niveles del mensajero de *FMR1* en células de ovario en cultivo.

Cómo ya se mencionó anteriormente, en un trabajo previo demostramos que la proteína FMRP se expresa a lo largo de todo el desarrollo folicular y que su expresión es mayor a medida que el folículo se diferencia. En forma contraria, el ARNm presenta niveles mayores en folículos menos desarrollados. En este trabajo analizamos si su expresión se regularía por la FSH. De estos ensayos concluimos que esta hormona no regularía la expresión del gen *Fmr1* al menos en el sistema en estudio.

Teniendo en cuenta la escasa información acerca de la patogenia de FXPOI, en una segunda etapa nos interesó encarar, de forma preliminar, el estudio de las posibles causas que pudieran estar relacionadas a una disfunción celular ante la presencia de tripletes en el rango de la premutación en células ováricas humanas en cultivo.

Nuestros resultados demostraron que, en concordancia con lo observado en diferentes experimentos y pacientes con FXTAS, existiría una tendencia hacia un aumento en la transcripción del gen con tripletes expandidos. Sin embargo, sería necesario continuar y confirmar estos ensayos dado que las variaciones aún no alcanzaron hasta el presente una significancia estadística. Asimismo, la cantidad de células que emitían fluorescencia verde a partir del vector reportero fue menor para todos los tiempos analizados en aquellas células que contenían el plásmido con 95 repeticiones CGG. Una posibilidad para explicar estas diferencias en la expresión de GFP podría ser que haya una mayor tasa de muerte celular en aquellas células que contienen 95 tripletes. Considerando que se ha descrito una disminución en la viabilidad celular de células transfectadas con tripletes

en el rango de la premutación, esta posibilidad sería válida para el caso de nuestras células. Sin embargo, a los efectos de comprobar esta hipótesis, sería necesario realizar estudios de viabilidad celular en las diferentes condiciones de transfección.

A nivel neuronal se ha relacionado al estado de premutación con posibles efectos apoptóticos en la célula. Si bien nuestros estudios aún no demuestran que el efecto de la introducción de tripletes en el rango de la premutación resulte en un aumento en la apoptosis de las células KGN, los resultados obtenidos abren la posibilidad de que este mecanismo sea analizado en un futuro.

SUMMARY:

Fragile X Mental Retardation Protein belongs to a small family of RNA-binding proteins. Its absence or inactivity is responsible for Fragile X Syndrome, the most common cause of inherited mental retardation. Despite its ubiquitous expression, FMRP function and expression remain almost understudied in non-neuronal tissues, though previous studies on germline development during oogenesis may suggest a special function of this protein also in ovarian tissue. In addition, the well documented association of *FMR1* premutation state with Fragile X-related Primary Ovarian Insufficiency adds interest to the role of FMRP in ovarian physiology.

In a previous work we demonstrated changes in *Fmr1* expression, both at the protein and mRNA levels in the rat ovary during follicular growth. The aim of the present work was to investigate if the expression of *Fmr1* mRNA and its protein, FMRP, are regulated by FSH. Follicles from DES treated rats were cultured with different amounts of FSH during 24hs. Protein expression was assessed by Western-blot and the level of messenger RNA was assayed by RT-qPCR. Our results showed no differences in both protein and RNA levels by the addition of different amounts of FSH.

In addition, we aim to investigate the putative pathogenic effects of the expanded CGG repeat, in ovarian culture. A reporter construct with a *FMR1* 5' untranslated region harboring an expanded (premutation) or normal CGG repeats was transfected into a human tumor granulosa cell line (KGN). Preliminary results showed that levels of GFP mRNA were higher in cells transfected with expanded CGG repeats in comparison to those of the normal range. Moreover, a reduced number of cells expressing green fluorescence were observed when the expanded vector was transfected.

BIBLIOGRAFÍA

1. Oostra BA, Willemsen R. *Biochim Biophys Acta*. 1790: 467-77, 2009.
2. Oostra B, Willemsem R. *Hum Mol Genet* 12: 249-57, 2003.
3. Allen E, He W, Yadav-Shah M, Sherman S. *Hum Genet* 114: 439-47, 2004.
4. Goswami D, Conway G. *Hum Reprod* 11: 391-410, 2005.
5. Nelson L. *N Engl J Med* 360 606-614, 2009.
6. Skillern A, Rajkovic A. *Sex Dev* 2:228-243, 2008.
7. Conway GS, Payne NN, Webb J, Murray A, Jacobs PA. *Hum Reprod* 13: 1184-7, 1998.
8. Murray A, Webb J, Grimley S, Conway G, Jacobs P. *J Med Genet* 35: 637-40, 1998.
9. Gersak K, Meden-Vrtovec H, Peterlin B. *Hum Reprod* 18:1637-40, 2003.
10. Bussani C, Papi L, Sestini R, y col. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 112:189-91, 2004.
11. Hagerman RJ, Hagerman P. *Curr Opin Genet Dev* 12: 278-83, 2002.
12. Musci TJ, Caughey AB. *Am J Obstet Gynecol* 192:1905-12, 2005.
13. Cronister A, DiMaio M, Mahoney MJ, Donnenfeld AE, Hallam S. *Genet Med* 7:246-50, 2005.
14. Allen EG, Sherman SL. *Am J Med Genet*. 97:189-194. 2000.
15. Sullivan AK, Marcus M, Small C, Dominguez C, y col. *Hum Reprod* 22: 2142-52, 2007.
16. Bachner D, Manca A, Steinbach, y col. *Hum Mol Genet* 2: 2043-50, 1993.
17. Rifé M, Nadal A, Milá M, Willemsen R. *Am J Med Genet A*. 124:129-32, 2004.
18. Jin P, Alisch RS, Warren ST. *Nat Cell Biol* 6:1048-53, 2004.
19. Tassone F, Hagerman RJ, Taylor AK, y col. *Am J Hum Genet* 66: 6-15, 2000.
20. Ferder I, Parborell F, Sundblad V, Chiauuzzi V, y col. *Reproduction* 145:335-343, 2013.
21. Hinds HL, Ashley CT, Sutcliffe JS, Nelson DL, Warren ST, y col. *Nat Genet* 3: 36-43, 1993.
22. Bakker CE, de Diego Otero Y, Bontekoe C, Raghoe P, Luteijn T, y col. *Exp Cell Res* 258:162-170, 2000.
23. Schuettler J, Peng Z, Zimmer J, Sinn P, von Hagens y col. *Hum Reprod* 26:1241-1251, 2011.
24. Willemsen R, Levenga J & Oostra BA *Clin Genet* 80:214-225. 2011 ,

25. Hoffman GE, Le WW, Entezam A, Otsuka N, y col. *J Histochem Cytochem.* 60:439-56. 2012.
26. Lu C, Lin L, Tan H, Wu H, Sherman SL, y col. *Hum Mol Genet* 21: 5039-5047, 2012.
27. Handa V, Goldwater D, Stiles D, Cam M, y col. *FEBS Lett* 579: 2702-2708, 2005.
28. Arocena DG, Iwahashi CK, Won N, Beilina A, y col. *Hum Mol Genet* 14: 3661-3671, 2005.
29. Hoem G, Raske CR, Garcia-Arocena D, Tassone F, Sanchez E, y col. *Hum Mol Genet* 20: 2161-2170, 2011.

ESTUDIO DEL INFILTRADO LINFOCITARIO EN UN MODELO DE REGRESIÓN TUMORAL INDUCIDA INMUNOLÓGICAMENTE

Graciela Isabel Dran

Instituto de Medicina Experimental IMEX- CONICET.

Academia Nacional De Medicina

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Actualmente se acepta que el sistema inmunológico (SI) tiene un papel importante en la progresión del cáncer; existe vasta evidencia acerca de la inmunidad antitumoral y de los mecanismos de escape que montan ciertos tumores para evadir la vigilancia inmunológica¹. Las terapias inmunológicas contra el cáncer tienen como finalidad exacerbar la inmunogenicidad propia del tejido tumoral o bien disminuir la inmunosupresión generada por el propio tumor². El modelo experimental utilizado en este trabajo es un fibrosarcoma murino (MCC) ampliamente usado para estudiar aspectos de la inmunidad tumoral. Tiene la particularidad de generar en el huésped una fuerte respuesta específica contra el tumor mediada por células T, que se manifiesta en etapas tempranas del desarrollo tumoral (hasta aproximadamente un volumen de 400-500 mm³). Al crecer, dicha respuesta va desapareciendo para dar paso a un estado de tolerancia inmunológica e inmunosupresión sistémica³. En trabajos previos de nuestro laboratorio desarrollamos un tratamiento inmunoterapéutico (IT) contra el MCC que consistió en la depleción de linfocitos B y células T regulatorias, la extirpación del ganglio linfático drenante del tumor (TDLN) y la transferencia adoptiva de células citotóxicas aisladas a partir de éste, previamente expandidas y activadas *in vitro*. Este tratamiento indujo un marcado aumento de la sobrevida y hasta un 70% de regresión de tumores ya establecidos⁴. Además, demostramos que el pasaje de un estadio inmunogénico a uno tolerogénico, así como la regresión inducida por IT, se acompañan de cambios notorios a nivel de la composición y activación de las células del TDLN y otros elementos del SI periférico.

El propio tumor está infiltrado por células inmunes. Una parte sustancial de su estroma está constituido por células inflamatorias, principalmente

linfocitos infiltrantes del tumor (TILs), cuyo papel es controvertido⁵. Originalmente, su presencia se consideraba evidencia de una respuesta inmune activa y se le asignaba un valor pronóstico positivo⁸. Estudios más recientes sugieren que por el contrario, los TILs también estarían involucrados en la inmunosupresión inducida por el tumor y en la promoción de su crecimiento, dado que incluyen células anérgicas y/o disfuncionales y predominan clones supresores⁹ TILs provenientes de tumores de ratones tratados.

Nuestra hipótesis es que la transición de un estado de inmunogenicidad a un estado de tolerancia durante el crecimiento del MCC, así como su regresión inducida por IT, se deberían reflejar en cambios a nivel de la composición y/o función de los TILs. Para evaluarla, nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1- Estudiar histológicamente tumores MCC en distintos estadios de crecimiento y en regresión, a fin de caracterizar los TILs y su ubicación en el tejido.
- 2- Aislar el infiltrado linfocitario según técnicas descritas previamente¹⁰ para caracterizarlo fenotípicamente y medir su capacidad citotóxica específica contra células tumorales.

METODOLOGÍA

Tumor MCC: El tumor MCC se mantiene por pasajes singeneicos en ratones BALB/c. Ratones machos de 2- 3 meses de edad se inocularon s.c. con 10 células MCC. El tumor MCC alcanza un tamaño de 180-280 mm al cabo de las 12-15 días de inoculadas las células tumorales (estadio de tumor establecido). Al cabo de 30-35 días post- inóculo los tumores alcanzan un tamaño de 650-950 mm (estadio de tumor avanzado). Los tumores fueron extraídos en cada una de estos estadios para su estudio.

Tratamiento inmunoterapéutico del tumor MCC: Los ratones portadores se inyectaron con una única dosis de Cy (50mg/kg). Tres días más tarde se les extrajo el LN drenante y las células ganglionares se cultivaron por 9 días en IL-2 + anti-CD3, para el aislamiento in vitro de linfocitos TCD8+ citotóxicos. Los mismos se reinocularon i.v. en los ratones donantes (10x10 céls). Este tratamiento produce la involución de un alto porcentaje de tumores a partir de

5-7 días después de su administración. Como controles se utilizaron ratones no tratados, sham- operados y tratados parcialmente.

Aislamiento de TILs a partir del MCC en crecimiento y en regresión: A distintos intervalos a partir de la aplicación del tratamiento, se extrajeron los tumores estérilmente y se aislaron los TILs por disociación mecánica seguida de sedimentación sobre Ficoll Hypaque.

Estudio inmunohistoquímico de los TILs: Otro grupo de tumores se fijó en formalina, se incluyó en parafina y se seccionó. Los cortes se procesaron y se incubaron con los anticuerpos correspondientes para la detección inmunohistoquímica de las diferentes poblaciones linfocitarias.

Citometría de flujo: Se extrajeron TILs de los tumores de los distintos grupos experimentales; 5x10⁵ - 1x10⁶ células se marcaron con los anticuerpos correspondientes a 4°C. Las células positivas se cuantificaron empleando un citómetro de flujo Becton Dickinson.

Anticuerpos monoclonales: Los marcadores de superficie de cada linaje celular se identificaron con los siguientes anticuerpos: anti-CD3, CD8 y CD4 para linfocitos T, CD19 y B220 para linfocitos B, y anti-CD44, CD25 y CD69, como marcadores de activación. Las células se permeabilizaron para la marcación intracelular de IFN-gamma; IL-10 y TGF-beta y el factor de transcripción FOXP3, el cual es específico de las células T regulatorias en ratón.

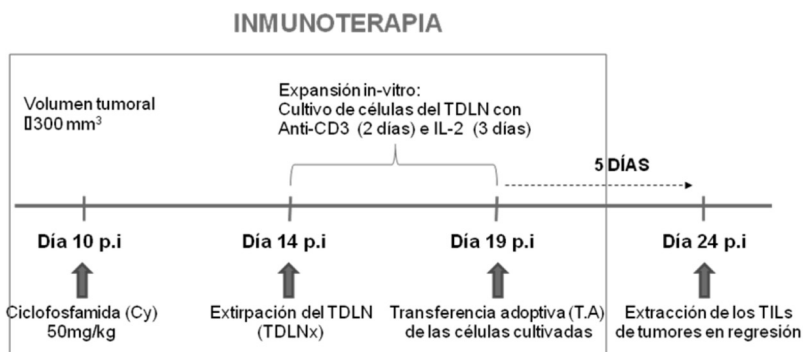
Producción de citoquinas: Los TILs se cultivaron con diferentes estímulos y se evaluó la producción de citoquinas en los sobrenadantes del cultivo mediante ELISA: IFN-gamma e IL-2 como citoquinas del tipo Th1, e IL-4 e IL-10 como características de respuesta Th2.

Actividad citotóxica de los TILs contra cultivos de MCC: Se evaluó la capacidad de los TILs de lisar células de MCC in vitro a través del Jam Test.

RESULTADOS

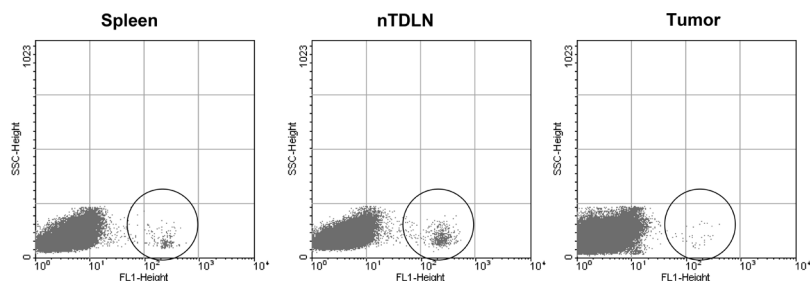
1. Protocolo inmunoterapéutico contra el tumor MCC:

Consiste en una dosis subtóxica de Ciclofosfamida + la extracción del ganglio drenante del tumor (TDLNx) + la transferencia adoptiva de células citotóxicas autólogas expandidas y estimuladas previamente ex vivo (TA).



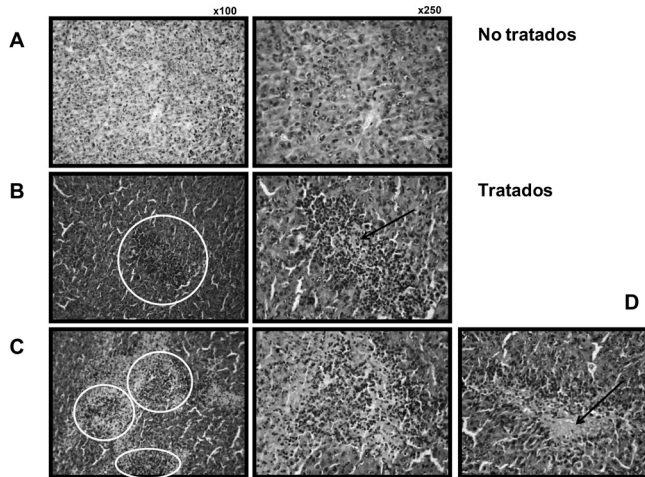
2. Seguimiento de las células utilizadas para transferencia adoptiva (TA)

Las células de la TA marcadas con CFSE se hallaron en los ganglios linfáticos, bazo y en el tumor a partir del día 5. Permanecen allí al menos hasta el día 7.



3. Estudio de los cambios producidos por la inmunoterapia a nivel los TILs

La inmunoterapia aumenta la infiltración linfocitaria. Se muestra el análisis histológico del tumor MCC sin tratamiento (A), y 7 (B) y 15 (C y D) días después de iniciado el tratamiento.



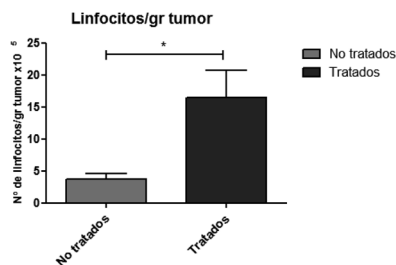
A) Tumores sin tratar: Tejido tumoral conservado, se observan células grandes con numerosas figuras mitóticas e infiltrado leucocitario tumoral escaso.

B) Tumor en el inicio de la regresión: Se observa la presencia de un foco de infiltrado predominantemente linfocitario (círculo) con una zona de muerte celular (necrosis) incipiente en su centro. Alrededor, el parénquima tumoral junto con su estroma se encuentran conservados.

C-D) Tumor en estado avanzado de regresión: Se observa la presencia de numerosos focos de infiltrado predominantemente linfocitario (círculos) en las zonas de muerte celular (necrosis) al mismo tiempo que se puede apreciar la coalescencia de las mismas. En la periferia, tanto el parénquima como el estroma tumoral se encuentran conservados con límites bien delineados con las zonas de necrosis y sin zonas de transición.

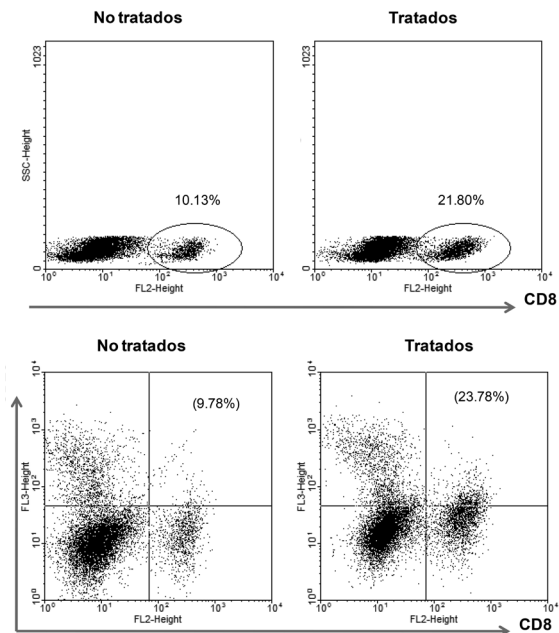
4- N° de linfocitos infiltrantes:

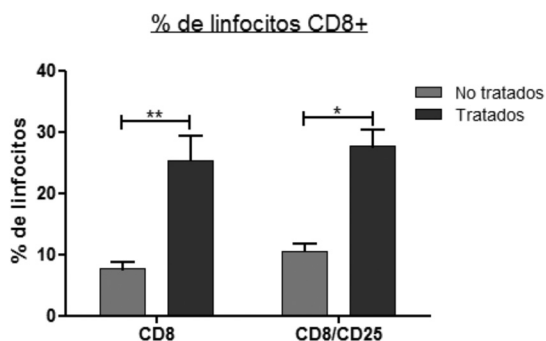
La IT produce un aumento significativo en el número total de linfocitos que infiltran el tumor.



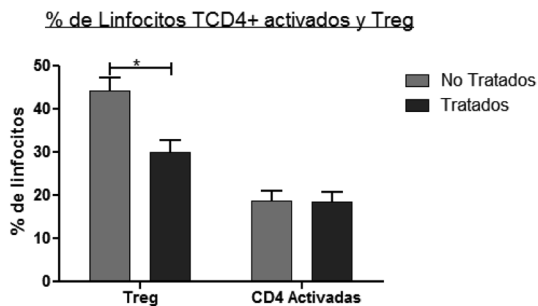
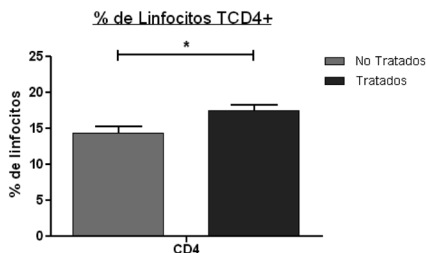
5- Composición fenotípica de los TILs

El tratamiento indujo un aumento en el porcentaje linfocitos CD8+ en el infiltrado tumoral, respecto de los TILs de tumores no tratados. En ratones tratados además, la población TCD8+ contiene mayor proporción de células activadas que expresan CD25.

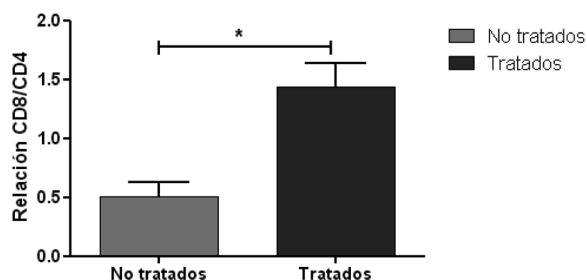




A nivel de la población TCD4+ dentro de los TILs, la IT aumentó su número y proporción relativa, y dentro de esta, se produjo un incremento de linfocitos T CD4 CD25+ Foxp3- (activados), y una disminución de aquellos regulatorios (T CD4 CD25+ Foxp3+). Por último, la IT indujo un aumento de la relación CD8+/CD4+ (indicadora de actividad citotóxica en el tumor).

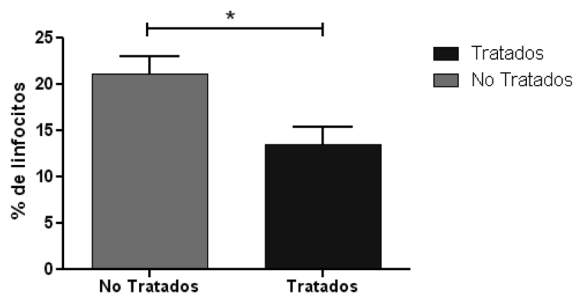


Relación entre CD8/CD4

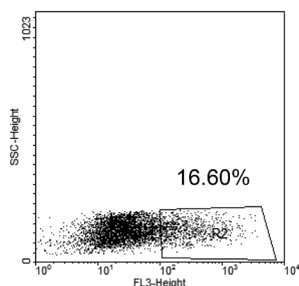


En cuanto a la población de linfocitos B, los TILs de tumores en regresión presentaron un menor porcentaje de linfocitos B (B220+), los cuales según nuestros estudios previos tienen un papel inmunosupresor.

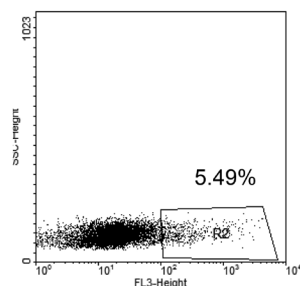
% de linfocitos B



No tratado



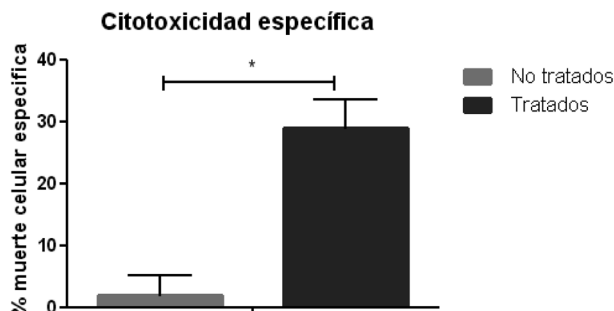
Tratado



B220

6- Actividad citotóxica contra células MCC in vitro:

Se observó que los TILs provenientes de tumores de ratones tratados (en regresión) presentan mayor actividad citotóxica específica contra células MCC en cultivo que aquellos aislados de tumores en crecimiento.



CONCLUSIONES

Los linfocitos infiltrantes del tumor o TILs están en contacto directo con las células malignas e interactúan con ellas a varios niveles. Si bien el alcance y los efectos de esta interacción no están esclarecidos totalmente¹¹, es esperable que sus características definan o respondan a cambios en la biología tumoral. La observación frecuente de células T infiltrando el tejido tumoral fue originalmente interpretada como evidencia del reconocimiento y montaje de una respuesta, y por lo tanto un factor pronóstico positivo. Sin embargo, es excepcional que los TIL induzcan el rechazo espontáneo del tumor una vez que éste se encuentra establecido. Aún en cánceres humanos, a pesar del considerable progreso en la identificación de antígenos asociados a tumores y del avance en los esquemas de vacunación, aún en tumores altamente inmunogénicos como el carcinoma renal y el melanoma, se observa que el tumor establece múltiples redes inmunosupresoras que se propagan interfiriendo con su reconocimiento y eventual rechazo. La importancia del estudio de los TIL reside no solamente en su valor pronóstico sino también en la creciente cantidad de estudios que planean su uso potencial como blanco de tratamientos inmunoterapéuticos¹³.

En trabajos previos, a partir de un fibrosarcoma murino fuertemente inmunogénico (MCC) que genera una robusta respuesta inmune, caracterizamos algunos de los fenómenos que tienen lugar a nivel de los ganglios linfáticos, bazo y sangre durante el crecimiento tumoral. En este estudio nuestro objetivo fue estudiar las modificaciones que se producen intratumoralmente, a nivel de las células inflamatorias que lo infiltran en diferentes etapas de su desarrollo, en particular durante su fase inmunogénica, tolerogénica y cuando se encuentra en regresión como consecuencia de un tratamiento inmunoterapéutico.

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que la pérdida de inmunogenicidad del tumor es acompañada por una notable disminución en el número de TILs y dentro de éstos, un aumento en la proporción de células regulatorias. Contrariamente, dentro de los tumores en remisión, los TILs son abundantes y se encuentran agrupados en focos donde más adelante se inicia la necrosis del tejido.

Estos focos tienen un predominio de células T CD4 y CD8 activadas y con mayor capacidad citotóxica que aquellos TILs aislados de tumores no tratados. A partir de estos resultados comenzamos a investigar los mecanismos involucrados en el reclutamiento diferencial de las células inflamatorias al tumor y/o en su activación in situ. En particular estamos evaluando el patrón de quimiocinas y citoquinas secretadas por las células tumorales y estromales en los distintos estadios.

RESUMEN

Las inmunoterapias del cáncer tienen como objetivo favorecer la inmunogenicidad del tumor a fin de propiciar su reconocimiento y eliminación por parte del sistema inmune del huésped. La especificidad y carencia de efectos secundarios le brindan beneficios sobre las terapias convencionales. Sin embargo, la principal limitación consiste en sobrepasar la inmunosupresión que el propio tumor genera.

El tumor MCC es un fibrosarcoma murino inducido por metilcolantreno, ampliamente utilizado para estudios sobre inmunidad tumoral. El inóculo de las células MCC en ratones BALB/c genera una fuerte respuesta específica antitumoral mediada por linfocitos T. A medida que el tumor crece, ésta decae gradualmente y desaparece dando lugar a un estado de tolerancia inmunológica contra el tumor e inmunosupresión sistémica. En trabajos anteriores diseñamos un protocolo inmunoterapéutico efectivo contra este tumor, que

consiste en una dosis subtóxica de ciclofosfamida seguida de la ablación del ganglio drenante del tumor y la transferencia adoptiva de células citotóxicas autólogas previamente activadas *ex vivo*. Este tratamiento indujo la regresión completa del 63% de los tumores y el enlentecimiento de aquellos tumores que no remitieron. Asimismo describimos los cambios que tienen lugar durante la regresión del tumor a nivel de las poblaciones celulares de los ganglios linfáticos drenantes. El objetivo de este trabajo consistió en analizar un posible rol de los TILs en el crecimiento y regresión tumorales. Específicamente comparamos las propiedades del infiltrado linfocitario presente en tumores MCC en crecimiento con aquellos presentes en tumores en regresión en cuanto a su composición y función. Los tumores fueron estudiados por técnicas histológicas e inmunohistoquímicas. Luego, se aislaron los TILs y se analizó su fenotipo por citometría de flujo. Por último, se extrajeron células T CD8 a partir del infiltrado tumoral de ambos grupos experimentales y se midió su capacidad citotóxica anti- MCC en cultivo.

Determinamos que los tumores en regresión presentan mayor número de TILs por gramo de tumor, con inversión de la relación TCD4/TCD8 respecto de aquellos en crecimiento. Su análisis histológico indicó que los TILs se encuentran agrupados en acúmulos rodeando zonas de muerte celular, contrariamente a aquellos presentes en tumores en crecimiento, que son escasos y se encuentran dispersos homogéneamente en el tejido. La inmunoterapia indujo un aumento en la proporción de linfocitos TCD8 activados conjuntamente con un aumento en su citotoxicidad específica *in vitro*. También, redujo la proporción de células T regulatorias y de linfocitos B. Los resultados permiten concluir que durante la regresión inducida inmunológicamente, el infiltrado linfocitario cambia en cuanto a su disposición espacial, a su composición y función, predominando focos de necrosis y células citotóxicas activadas y disminuyendo la proporción de células regulatorias.

ABSTRACT

The role of the host immune system in the control of cancer has been assessed for several years; nowadays it is vastly accepted that the antitumor immunity occurs and that tumors have developed mechanisms to escape immune control. The murine sarcoma MCC is a widely used model for studying tumor immunity, given that tumor implant leads to a strong T cell-mediated specific immune response. As the tumor grows, this response progressively

decreases and disappears leading to a state of systemic immune suppression and tumor tolerance. In previous studies we have designed an immune-therapeutic protocol (IT) against MCC which induced 63% of tumor regression and the lower growth of tumors that did not undergo remission. One of the main components of the immune system in close contact with tumor tissue are the tumor infiltrating lymphocytes (TILs). The presence of TILs has been classically associated with a favorable prognosis in patients. However, new aspects related to a role of TILs as negative modulators of the anti-tumor response are currently being investigated. The aim of this work was to study the composition and role of TILs infiltrating growing tumor and to compare them with TILs from IT-treated regressing tumors. Histological analysis, TILs isolation and phenotyping were performed. Results indicated that tumors in remission after IT showed a markedly higher number of TILs. Among them, the rate CD8/CD4 was inverted compared to non-treated tumors. Regressing tumors showed increased IFN gamma expressing- CD8+T cells and decreased B cells and Treg proportion. Moreover, TILs from regressing tumors exhibit higher cytotoxicity against MCC cells in culture than those from growing tumors. We concluded that regressing tumors are more profusely infiltrated and that among TILs, there are less suppressor cells and more cytotoxic cells around foci of necrotic tissue.

REFERENCIAS

1. Cavallo F, De Giovanni C, Nanni P, Forni G, Lollini PL (2011) 2011: the immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunol Immunother* 60(3):319-26.
2. Franco M et al. *Br J Cancer* 74:178
3. Franco M, et al. *Oncol Reports* 2000; 7:1053.
4. Maglioco A Machuca D, Mundiñano J, y cols. *Cancer Immunol Immunother* 2011; 0(3): 389-99.
5. Mueller M. et al. *Nat Rev Cancer* 4(11):839
6. Spiess P. et al. *JNCI* 79(5):1067
7. Burger U. et al. *Ann Surg Oncol* 3(6):580.
8. Clemente C. et al. *Cancer* 77:1303
9. Blohm U. et al. *J Immunol* 169(10):5522
10. Rosenberg SA et al. *Science* 233:1318
11. Galon J, et al. (2006) Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313:1960–1964.

12. Deschoolmeester V. et al (2010) Tumor infiltrating lymphocytes: an intriguing player in the survival of colorectal cancer patients. *BMC Immunol* 11:19.
13. Nguyen L.T. (2010) Expansion and Characterization of Human Melanoma Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TILs). *PLoS ONE Volume 5*.
14. Gwendoline Rahir and Muriel Moser (2012). Tumor microenvironment and lymphocyte infiltration. *Cancer Immunol Immunother Published online April 2012*.

MELATONINA Y SU INFLUENCIA EN LA FUNCIÓN TESTICULAR: UN ESTUDIO DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN Y SU POTENCIAL RELEVANCIA EN PATOLOGÍAS GONADALES.

Soledad Paola Rossi*‡, Stefanie Windschuettl†, María Eugenia Matzkin*‡,
Claudio Terradas§¥, Roberto Ponzio‡, Elisa Puigdomenech§, Oscar
Levalle¥, Ricardo Saúl Calandra*, Artur Mayerhofer†, Mónica Beatriz
Frungieri*‡

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

‡ Facultad de Medicina, UBA, Buenos Aires, Argentina. †Anatomie III – Zellbiologie,

Universität München, Munich, Alemania. §Instituto Médico PREFER, San Martín,

Argentina. ¥División Endocrinología, Hospital Durand, Buenos Aires, Argentina

RESUMEN

La melatonina producida y secretada por la glándula pineal durante la fase de oscuridad diaria, juega un rol clave en el control de los ritmos circadianos corporales y de ciertas funciones fisiológicas (Reiter, 1991). Además de su acción regulatoria sobre el eje hipotálamo-hipófiso-testicular, esta neuro-hormona liberada a circulación general desde la glándula pineal, alcanza el testículo ejerciendo acciones directas sobre la gónada. En este contexto, hemos descripto previamente un rol modulador negativo de la melatonina sobre la producción de andrógenos testiculares en el hámster Dorado. El hámster Dorado es una especie que presenta ciclos reproductivos anuales controlados por el fotoperíodo y la secreción pineal de melatonina (Bartke, 1985). Dicho efecto inhibitorio de la melatonina sobre la síntesis testicular de testosterona es ejercido a través de receptores melatoninérgicos del subtipo mel1a e inhibición de la expresión de la proteína de regulación aguda de la esteroidogénesis (StAR) y enzimas esteroidogénicas claves (P450scc, 3 β -hidroxi-esteroide deshidrogenasa y 17 β -hidroxi-esteroide deshidrogenasa). Involucra además, la participación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH), receptores CRH-R1 localizados en las células de Leydig, inhibición de la actividad de fosfatasa de tirosinas, y la consiguiente disminución en el grado de fosforilación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (P42/44 y JNK46/54) y en los niveles de expresión de factores de transcripción (c-fos y c-jun) (Frungieri y col., 2005; Rossi y col., 2012).

Los principales componentes del sistema melatonina/CRH descrito en el testículo del hámster Dorado y asociado a la inhibición de la producción de andrógenos, se hallan también presentes en células de Leydig del testículo humano (Rossi y col., 2012). Sin embargo, las células de Leydig no son el único blanco de la melatonina en la gónada masculina. Mediante la técnica de microdissección por captura láser, se aislaron macrófagos y mastocitos testiculares a partir de biopsias de pacientes que presentan hipoespermatogénesis o síndrome de sólo células de Sertoli. Estudios posteriores de RT-PCR nos permitieron establecer que estas células inmunes del testículo expresan receptores melatoninérgicos (Figura 1).

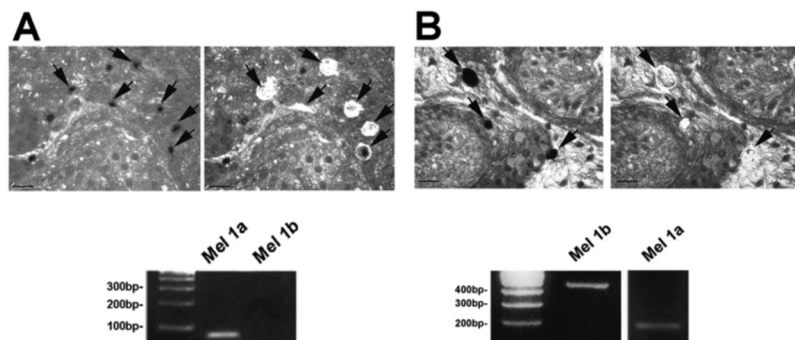


Figura 1. Localización de macrófagos inmunorreactivos para la glicoproteína CD68 (Panel A) y mastocitos inmuno-positivos para la proteasa de serinas triptasa (Panel B), en testículos de pacientes que presentan infertilidad idiopática.

Los macrófagos y mastocitos testiculares fueron aislados mediante la técnica de microdissección por captura láser. Para ello, las células de interés fueron inicialmente delimitadas y posteriormente capturadas en un microtubo estéril. Las imágenes ilustran las biopsias antes y luego de finalizado el proceso de microdissección, respectivamente. Barra 25 μ m.

Posteriormente, se evaluó mediante RT-PCR, la expresión de los receptores melatoninérgicos Mel1a (78pb) y Mel1b (422pb).

Estos resultados iniciales nos permiten sugerir que la melatonina no solo participaría en la regulación local de la esteroidogénesis, sino que podría modular también la actividad de ciertas células inmunes en el testículo.

La presencia de macrófagos y mastocitos ha sido descrita en el testículo de prácticamente todos los mamíferos. En la gónada humana, estas células inmunes se localizan principalmente en el espacio intersticial, aunque

en biopsias de pacientes infértiles, son también detectadas en la pared de los túbulos seminíferos (Meineke y col., 2000; Frungieri y col., 2002a).

Los macrófagos producen y secretan más de 100 factores diferentes, incluyendo citoquinas y mediadores solubles (Hedger, 1997). Los mastocitos son capaces de secretar una amplia variedad de moléculas moduladoras, entre ellas, proteoglicanos, prostaglandinas, citoquinas, factores de crecimiento y proteasas. Estas células inmunes son ampliamente conocidas por su participación en procesos inflamatorios. Sin embargo, en el testículo, parecieran estar implicadas además, en la regulación de la esteroidogénesis, actividad de las células de Sertoli, supervivencia de las células germinales y generación de eventos fibróticos en la pared de los túbulos seminíferos (Sun y col., 1993; Aguilar y col., 1995; Kmicikiewicz y col., 1999; Meroni y col., 2000; Meineke y col., 2000; Frungieri y col., 2002a y 2002b; Theas y col., 2008; Winnall y col., 2011; Winnall y Hedger, 2013).

En este trabajo de investigación se determinó, de manera original, la concentración de melatonina en biopsias testiculares de pacientes que presentan infertilidad idiopática, empleando un ensayo de ELISA. Los valores obtenidos oscilan entre 100 y 200 fmol/g de tejido. Se observó una correlación inversa de la concentración testicular de melatonina con el número de macrófagos gonadales ($r = 0.66$, $p < 0.05$) y la expresión testicular de $TNF\alpha$ ($r = 0.73$, $p < 0.05$), $IL1\beta$ ($r = 0.86$, $p < 0.05$) y de ciclo-oxigenasa 2 (COX2, enzima clave en la biosíntesis de prostaglandinas) ($r = 0.88$, $p < 0.05$). Sin embargo, la concentración testicular de melatonina no mostró correlación alguna con el número de mastocitos gonadales, aunque describió una correlación directa con la expresión testicular de las enzimas anti-oxidantes catalasa ($r = 0.76$, $p < 0.05$), peroxirredoxina 1 ($r = 0.78$, $p < 0.05$) y superóxido dismutasa 1 ($r = 0.81$, $p < 0.05$).

Ante la imposibilidad de realizar estudios funcionales en biopsias testiculares humanas, hemos empleado modelos experimentales alternativos a fin de investigar el rol ejercido por la melatonina sobre las poblaciones de macrófagos y mastocitos.

Los resultados obtenidos empleando macrófagos testiculares purificados a partir de testículos de hámsteres Dorados, y la línea celular de macrófagos humanos no testiculares THP-1, describen una acción inhibitoria ejercida por melatonina sobre la actividad metabólica celular y la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), sin afectar la viabilidad. Además, la presencia de melatonina en el medio de incubación de macrófagos humanos THP-1 y macrófagos testiculares del hámster, disminuyó la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias $TNF-\alpha$ e $IL-1\beta$, así como la expresión de COX2.

Cuando la línea celular de mastocitos humanos (HMC-1) fue incubada en presencia de melatonina, se detectó un aumento significativo en la expresión de proteasas de serinas (triptasa y quimasa) y las enzimas anti-oxidantes previamente mencionadas, así como también una marcada disminución en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) que fue determinada a través de la cuantificación de la intensidad de fluorescencia resultante de

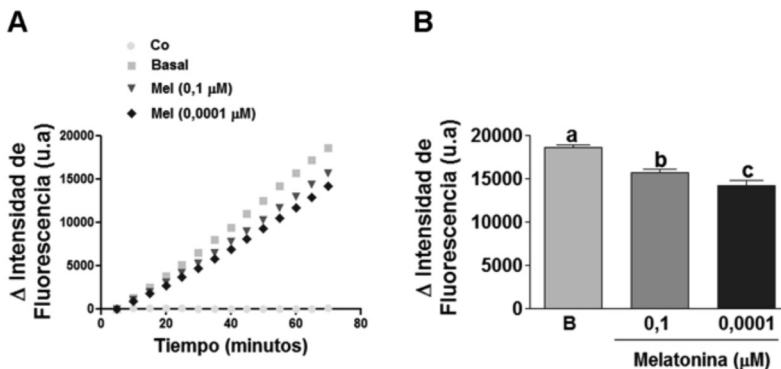


Figura 2. Efecto de melatonina sobre la generación de ROS en mastocitos humanos HMC-1. **A)** El gráfico representa el delta (Δ) de intensidad de fluorescencia cuantificada cada 5 minutos durante un período de 70 minutos, y expresada en unidades arbitrarias (u.a). **B)** Comparación de la fluorescencia generada luego de 70 minutos, en los grupos experimentales analizados: B (células sin tratamiento con melatonina), Co (grupo control; H2DCFDA, sin células) y presencia de melatonina (0,1 μ M y 0,0001 μ M). Diferentes letras denotan diferencias significativas ($p < 0,05$; *Test Student-Newman-Keuls*).

Los resultados alcanzados sugieren un rol anti-proliferativo de la melatonina sobre la población de macrófagos testiculares, pero también un rol anti-inflamatorio de esta neurohormona, afectando la producción de citoquinas y prostaglandinas. Contrariamente al rol anti-proliferativo en macrófagos, melatonina no ejercería efecto alguno sobre la tasa de proliferación en mastocitos de la gónada. No obstante, se detectaron acciones anti-oxidantes de esta indolamina sobre la población mastocitaria. Nuestros estudios son avalados por numerosas investigaciones previas que describen la capacidad protectora de melatonina ante el daño oxidativo (Reiter y col., 2003; Mayo y col., 2002; Rodríguez y col., 2004). Además, melatonina disminuyó significativamente la relación pro-apoptótica BAX/BCL-2 en macrófagos THP-1 y mastocitos HMC-1. Estos resultados nos sugieren que la función anti-oxidante

de melatonina sobre los mastocitos testiculares, se encontraría asociada a eventos anti-apoptóticos (Figura 3).

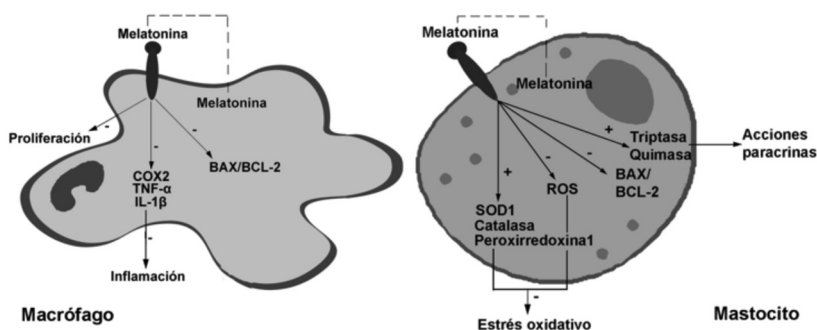


Figura 3. Representación esquemática del efecto de melatonina en células inmunes del testículo.

En los macrófagos testiculares, melatonina participa en la modulación de la proliferación y la expresión de COX2 (enzima clave en el camino biosintético de las prostaglandinas), ciertas citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α e IL-1 β) y genes apoptóticos (BAX/BCL-2), sugiriendo una importante función anti-inflamatoria y anti-proliferativa de esta indolamina.

En los mastocitos gonadales, melatonina induce la expresión de las proteasas de serinas (triptasa y quimasa). Además, melatonina inhibe la generación de ROS y modula la expresión de enzimas anti-oxidantes y de genes apoptóticos, sugiriendo un papel anti-oxidante de esta hormona en mastocitos del testículo humano.

En resumen, este trabajo de investigación describe acciones locales de la melatonina en diferentes poblaciones celulares somáticas del testículo. Además de su conocida acción sobre el eje hipotálamo-hipófiso-testicular, en el testículo humano, la melatonina desempeñaría un rol de importancia en la modulación del ambiente inmunológico a través de sus acciones sobre las poblaciones locales de mastocitos y macrófagos, y por consiguiente, sobre el desarrollo de respuestas anti-proliferativas, anti-inflamatorias y anti-oxidantes.

En consecuencia, la melatonina no solo modularía la actividad testicular en especies de reproducción estacional controlada por el fotoperíodo, sino también en especies reproductivamente independientes del fotoperíodo como el hombre, particularmente, en situaciones que conlleven a una espermatogénesis reducida o alterada.

ABSTRACT

Melatonin regulates testicular function acting through two independent mechanisms: 1) via its action on the hypothalamus and pituitary, and 2) directly at the testicular level.

We have previously described that melatonin inhibits androgen production in hamster Leydig cells via melatonin subtype 1a (mel1a) receptors and the local corticotropin releasing hormone (CRH) signaling pathway. Melatonin and all components of the melatonergic/CRH system are detected in Leydig cells of infertile men. Furthermore, melatonergic receptors are also found in macrophages and mast cells of the human testis. In biopsies of patients with idiopathic infertility (i.e. patients suffering from hypospermatogenesis or Sertoli cell only syndrome), melatonin testicular concentrations were negatively correlated with macrophage number and the expression of TNF α , IL1 β and cyclooxygenase 2 (COX2), but positively correlated with the expression of the anti-oxidant enzymes SOD1, peroxiredoxin 1 and catalase.

In both the human non-testicular THP-1 macrophage cell line and primary cell cultures of hamster testicular macrophages, melatonin inhibited proliferation and the expression of pro-inflammatory cytokines and COX2.

In the human HMC-1 mast cell line, melatonin increased the expression of anti-oxidant enzymes and decreased reactive oxygen species (ROS) generation.

Thus, our results reveal new cell targets of melatonin in the testis. In testicular macrophages, melatonin describes anti-proliferative and anti-inflammatory effects. Furthermore, melatonin might provide protective effects against oxidative stress in testicular mast cells.

REFERENCIAS

1. Aguilar R y col. Testicular serotonin is related to mast cells but not to Leydig cells in the rat. *J Endocrinol* 146: 15-21, 1995.
2. Bartke A. Male hamster reproductive endocrinology. En: *The Hamster*. Spiegel HI (Ed.), Plenum Publ Corp, pp 78-98, 1985.
3. Frungieri MB y col. Number, distribution pattern, and identification of macrophages in the testes of infertile men. *Fertil Steril* 78: 298-306, 2002a.
4. Frungieri MB y col. Direct Effect of Melatonin on Syrian Hamster Testes: Melatonin Subtype 1a Receptors, Inhibition of Androgen Production,

- and Interaction with the Local Corticotropin-Releasing Hormone System. *Endocrinology* 146: 1541-1552, 2005
5. Frungieri MB y col. Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR2, COX2, prostaglandins, and PPARgamma: possible relevance to human fibrotic disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 15072-15077, 2002b.
 6. Hedger MP. Testicular leukocytes: what are they doing? *Rev Reprod* 2: 38-47, 1997.
 7. Kmicikiewicz I y col. The effect of testicular macrophages, macrophage-conditioned medium and interleukin-1alpha on bank vole Leydig cell steroidogenesis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107: 262-271, 1999.
 8. Mayo JC y col. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell Mol Life Sci* 59: 1706-1713, 2002.
 9. Meineke V y col. Human testicular mast cells contain tryptase: increased mast cell number and altered distribution in the testes of infertile men. *Fertil Steril* 74: 239-244, 2000.
 10. Meroni SB y col. Interleukin-1beta regulates nitric oxide production and gamma-glutamyl transpeptidase activity in Sertoli cells. *J Androl* 21: 855-861, 2000.
 11. Reiter RJ y col. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Bioquimica Polonia* 50: 1129-1146, 2003.
 12. Reiter RJ. Pineal melatonin cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 12: 151-180, 1991.
 13. Rodriguez C y col. Regulation of antioxidant enzymes: A significant role for melatonin. *J Pineal Res* 36: 1-9, 2004.
 14. Rossi SP y col. New insights into melatonin/CRH signaling in hamster Leydig cells. *Gen Comp Endocrinol* 178: 153-163, 2012.
 15. Sun XR y col. The effect of testicular macrophages and interleukin-1 on testosterone production by purified adult rat Leydig cells cultured under in vitro maintenance conditions. *Endocrinology* 132: 186-192, 1993.
 16. Theas MS y col. Tumour necrosis factor-alpha released by testicular macrophages induces apoptosis of germ cells in autoimmune orchitis. *Hum Reprod* 23: 1865-1872, 2008.
 17. Winnall WR y Hedger MP. Phenotypic and functional heterogeneity of the testicular macrophage population: a new regulatory model. *Reprod Immunol* 97: 147-158, 2013.
 18. Winnall WR y col. Differential responses of epithelial Sertoli cells of the

- rat testis to Toll-like receptor 2 and 4 ligands: implications for studies of testicular inflammation using bacterial lipopolysaccharides. *Innate Immun* 17: 123-136, 2011.
19. Yee JB y Hutson JC. Testicular macrophages: isolation, characterization and hormonal responsiveness. *Biol Reprod* 29: 1319-1326, 1983.

EFFECTO REGULATORIO SOBRE EL NEUROTROFISMO DE LAS INMUNOFILINAS FKBP51 Y FKBP52.

Hector R. Quintá, Cristina Daneri-Becerra y Mario D. Galigniana.

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

Vuelta De Obligado 2490, C.a.b.a. (C1428)

INTRODUCCIÓN

Las inmunofilinas (IMMs) son proteínas que unen drogas inmunosupresoras tales como la ciclosporina A, en cuyo caso pertenecen a la subfamilia de las ciclofilinas (CyPs), o bien unen al macrólido FK506 (o tacrolimus), en cuyo caso pertenecen a la subfamilia FKBP (por **FK506-binding** proteins) [1]. El fenómeno de la inmunosupresión depende exclusivamente de las IMMs de más bajo peso molecular de cada subfamilia (i.e., CyP17 y FKBP12, de 17-kDa y 12-kDa respectivamente) [2], mientras que las otras proteínas de mayor peso molecular no participan de este proceso, si bien conservan los dominios estructurales que les permiten interactuar con la droga [3].

A pesar de su abundancia en los distintos tipos celulares, la función biológica de las IMMs de alto peso molecular es poco conocida. Las IMMs fueron originalmente descritas como parte de los heterocomplejos asociados a los receptores esteroidales [4]. Tal asociación ocurre vía la chaperona Hsp90 que se encuentra unida al receptor y es esencial para que el mismo tenga alta afinidad por su esteroide. Las IMMs se unen a Hsp90 vía su dominio TPR (*tertratricopeptide repeats*), o secuencias de 34 aminoácidos que se repiten en tándem y participan de interacciones proteína-proteína.

Nuestro laboratorio fue el primero en asignarle a las IMMs de alto peso molecular una función biológica definida: regulan el transporte hacia el núcleo del receptor [5]. En tal sentido, FKBP52 interactúa con el complejo motor dineína/dinactina el que es reclutado al receptor de manera esteroide-dependiente, favoreciendo así su retrotransporte. Por otra parte, debido a que FKBP51 no se asocia al complejo motor, dificulta la translocación del receptor al núcleo, tal que el balance FKBP52/FKBP51 sería el responsable de la mayor o menor acumulación nuclear del factor transcripcional [6]. Estos hallazgos fueron confirmados por otros laboratorios y, más recientemente,

este modelo se extendió a la relocalización subcelular de otros factores transcripcionales tales como p53, RAC3, ecdisoma y NFkB [1, 7, 8]. Luego, encontramos que FKBP51 y FKBP52 también poseen propiedades antagónicas sobre la actividad transcripcional de esos mismos factores nucleares, siendo inhibitoria la acción de la FKBP51 (excepto en la respuesta androgénica) y estimulante la de la FKBP52 [9].

Debido a que ambas FKBP5 son 50 veces más abundantes en el SNC que en los tejidos de origen mesodérmico en donde se las describió originalmente, nos interesamos por su rol biológico en el tejido nervioso. En ensayos preliminares observamos que cuando se tratan células de neuroblastoma murino indiferenciadas con la droga FK506, en muy poco tiempo (3-4 h) adoptan un fenotipo neuronal. Además de inducirse la expresión de FKBP52 (no así la de FKBP51), aquella IMM se relocaliza de la periferia nuclear al citoplasma, concentrándose en terminales axónicos y en puntos de ramificación axonal. Ello nos llevó a plantear el estudio del posible rol biológico de estas IMMs en el proceso de diferenciación neuronal, y si estas observaciones realizadas in vitro tienen su correlato in vivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

- *Cultivos celulares:* Se utilizaron células indiferenciadas N2a (neuroblastoma murino) crecidas en un medio constituido por partes iguales de DMEM y Opti-MEM (Invitrogen) suplementado con 5% de suero fetal bovino (Internegocios) y 2 mM glutamina (Sigma). Los cultivos primarios de células hipocámpales murinas se realizaron con células aisladas en el día 17 de gestación siguiendo el método descrito en la literatura [10]. Las transfecciones se realizaron utilizando 1 µg de plásmido por placa de 35 mm con 1 ml de medio según el método de precipitación con fosfato de calcio [9]. Los plásmidos utilizados fueron pCI-Neo-flag-hFKBP51, pCI-Neo-hFKBP52 o vector vacío. Las estimulaciones con FK506 se realizaron a los tiempos indicados con una concentración final de 1 µM disuelta en DMSO como vehículo.
- *Respuesta biológica al daño tisular y regeneración in vivo:* Se usó el modelo de lesión de médula espinal por cirugía a nivel de la vértebra torácica T8-T10 [11] en ratones C57/bl6 tratados con FK506 (3 mg/Kg, dosis única intraperitoneal) durante dos semanas. La evaluación de la

recuperación se hizo usando el test BBB (*Basso, Beattie & Bresnahan locomotor rating score*) [12]. La escala para el score también respondió a lo descrito en la literatura. La neuroprotección se estudió por shock isquémico. La muerte neuronal se evaluó por TUNEL en cortes del hemisferio ipsilateral, usándose el contralateral con fines comparativos.

- *Inmunofluorescencias Indirectas:* Las células fueron crecidas sobre cubreobjetos pretratados con poli-lisina. La fijación se realizó durante 30 min en 4% p-formaldehído. Los anticuerpos utilizados fueron UP30 policlonal de conejo contra FKBP52 (donado por Dr. William B. Pratt), MG19 monoclonal de ratón (desarrollado en el laboratorio) ó policlonal de conejo (Affinity Bioreagents) anti-FKBP51, JJ3 monoclonal anti-p23 (Affinity Bioreagents), 8D3 IgM monoclonal de ratón anti-Hsp90 (donado por Dr. William B. Pratt), monoclonal de rata contra Br-uridina (Abcam), y el correspondiente contra-anticuerpo marcado con Alexa (488, 546, 647) de Molecular Probes. El microscopio confocal es un Karl Zeiss LSM710.
- *Western blots:* Las células o tejidos fueron homogenizados en buffer 10 mM Hepes a pH 7,4 suplementado con 1 mM EDTA, 20 mM molibdato de sodio, 20 mM NaCl y 0,1% SDS. Las proteínas fueron resueltas por PAGE/SDS seguido de Western blot, el que se reveló por ECL. Los anticuerpos (no descritos en el ítem anterior) fueron: monoclonal de ratón anti-Hsp72/73 (StressGen), AC88 monoclonal de ratón anti-Hsp90αβ (StressMarq), A3S monoclonal de conejo anti-histona H3 (Upstate), HM2 monoclonal de ratón anti- Map-2 (Sigma), TUJ1 monoclonal anti-Tau-1 (Chemicon), y anticuerpos secundarios-HRP (Sigma). Las membranas para electrotransferencia fueron Immobilon-P (Millipore).

RESULTADOS

FK506 favorece la diferenciación neuronal en líneas celulares y cultivos primarios.

La Fig.1-A muestra que las células N2a de neuroblastoma murino cambian su morfología luego de ser incubadas durante 3 h con 1 μ M FK506. De redondeadas pasan a ser fusiformes y emiten prolongaciones polarizadas. Al cabo de 24 muestran un fenotipo neuronal. Las imágenes de inmunofluorescencia indirecta obtenidas por microscopía confocal para la inmunofili-

na Hsp90 y sus cochaerona asociadas FKBP52 y p23 muestran que en las células indiferenciadas, las tres proteínas se concentran en la periferia nuclear

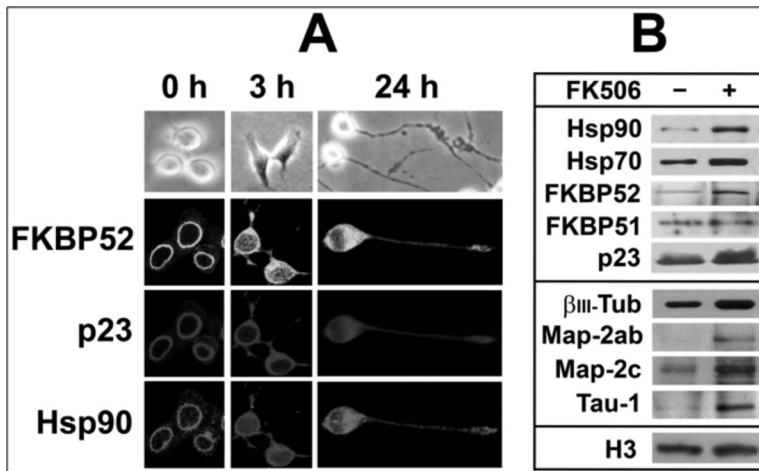


Fig.1. *Efecto neurodiferenciador de FK506.* A). Cambios fenotípicos de células N2a en función del tiempo y redistribución subcelular de las chaperonas por microscopía confocal. B). Inducción de chaperonas y marcadores neuronales en presencia de FK506 (24 h). formando una estructura anular, pero que luego de ser incubadas con FK506 abandonan el núcleo diseminándose en el citoplasma concentrándose en el terminal axónico y puntos de ramificación. Todos estos resultados también se obtuvieron con células embrionarias aisladas de hipocampos murinos en el día 17 de gestación (no mostrado en la figura).

La Fig.1-B muestra que, además de inducirse los marcadores neuronales esperados (β III-tubulina, Map2 y Tau) como consecuencia de la diferenciación gatillada por FK506, las chaperonas también se inducen, excepto FKBP51. Debido a los cambios en la expresión de proteínas del citoesqueleto, se utilizó a la histona H3 como control de carga.

El complejo de chaperonas es intranuclear y se asocia a la lamina. Al estudiar la naturaleza de las estructuras perinucleares las encontramos asociadas a la heterocromatina que se localiza adyacente a la envoltura nuclear. La Fig.2-A muestra su colocalización con lamina B. Los mismos resultados cuali-cuantitativos se lograron con células indiferenciadas aisladas del hipocampo de embriones de rata de 17 días de gestación. Contrariamente a FKBP52,

FKBP51 se distribuye de manera difusa en las células indiferenciadas y se concentra en la periferia nuclear cuando las células se diferencian (fotos no mostradas).

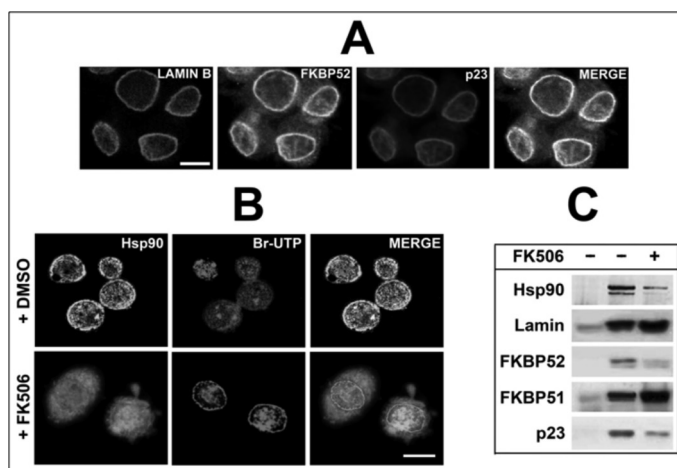


Fig.2. *Asociación de las chaperonas con áreas heterocromáticas.* A). La microscopía confocal muestra colocalización con lamina B. B). Las áreas perinucleares se transforman en transcripcionalmente activas cuando las chaperonas se dispersan en el citoplasma en presencia de FK506. C). Coimmunoprecipitación de FKBP5, Hsp90 y p23 con lamina B. La primera calle corresponde a una IgG no específica. Notar la pérdida de Hsp90 y FKBP52 y el reclutamiento de FKBP51 luego de exponer las células a 1 μ M FK506 por 24 h.

Ello indica que FKBP51 podría ocupar los sitios dejados por FKBP52 durante las etapas tempranas de la diferenciación. La purificación de la envoltura nuclear por métodos bioquímicos convencionales [13] y la subsiguiente inmuoadsorción de lamina B resultó en la coimmunoprecipitación de Hsp90, p23 y FKBP5. La presencia de FK506 intercambia a FKBP52 por FKBP51 en estos complejos perinucleares, y libera a Hsp90 y p23, las que se redistribuyen en el citoplasma tal como se observó por microscopía confocal en la Fig. 1-A.

La sobreexpresión de FKBP52 favorece la diferenciación neuronal. La Fig.3-A muestra la progresión temporal del crecimiento de neuritas en presencia de FK506 comparado con células tratadas con ciclosporina A (CsA), un agente inmunosupresor que media su acción vía ciclofilinas de manera idéntica a la de complejos FK506•FKBP12 [2, 14]. Claramente, el efecto dife-

renciador es dependiente de una FKBP y no está relacionado con la acción inmunosupresora, ya que CsA carece de efecto.

Por otra parte, debido a que FK506 se une con afinidad equivalente a ambas IMMs, FKBP51 y FKBP52 [14], nos preguntamos cuál de las dos proteínas es la más relevante para tal efecto. La Fig. 3-B muestra que el largo neuronal de células transfectadas con FKBP52 es significativamente mayor que en los controles, mientras que el efecto opuesto se observó en células que sobreexpresan FKBP51. FK506 posee acción neuroregeneradora. Para explorar si FK506, además de ser una droga neurotrófica, posee acción neuroregeneradora, se generó un daño con el extremo de una aguja en los cultivos de neuronas hipocampales aisladas de embriones murinos. Luego de generar la herida en el cultivo, las células fueron incubadas con FK506 o vehículo (DMSO) en los controles, observándose la potencial presencia de neuritas cruzando la herida en los cultivos tratados con FK506. La Fig. 4 muestra que aquellas células incubadas con vehículo no fueron capaces de recuperar sus neuritas (notar

que el "canal" está vacío, flecha). En cambio, los cultivos estimulados con el ligando de las IMMs muestran un alto número de neuritas cruzando el espacio vacío de la herida. Notar también que FKBP52 (verde) se ha diseminado desde el núcleo a todo el citoplasma dando una coloración amarilla sobre el fondo rojo de β III-tubulina, lo que se condice con lo observado en la Fig.1-A.

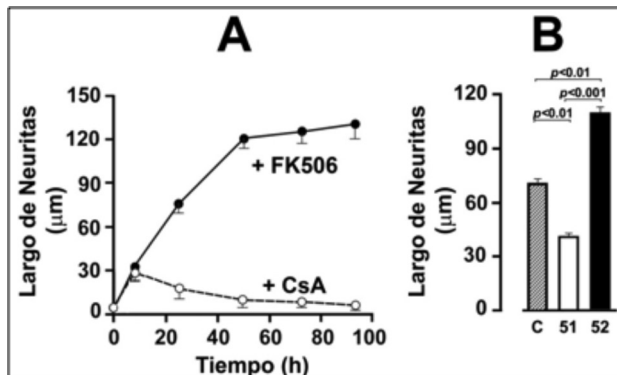


Fig.3. Acción neurotrófica de FKBP5s. A). Efecto trófico de FK506 comparado con ciclosporina A. B). Largo neurítico en células transfectadas con FKBP51 (51) y FKBP52 respecto del control (C).

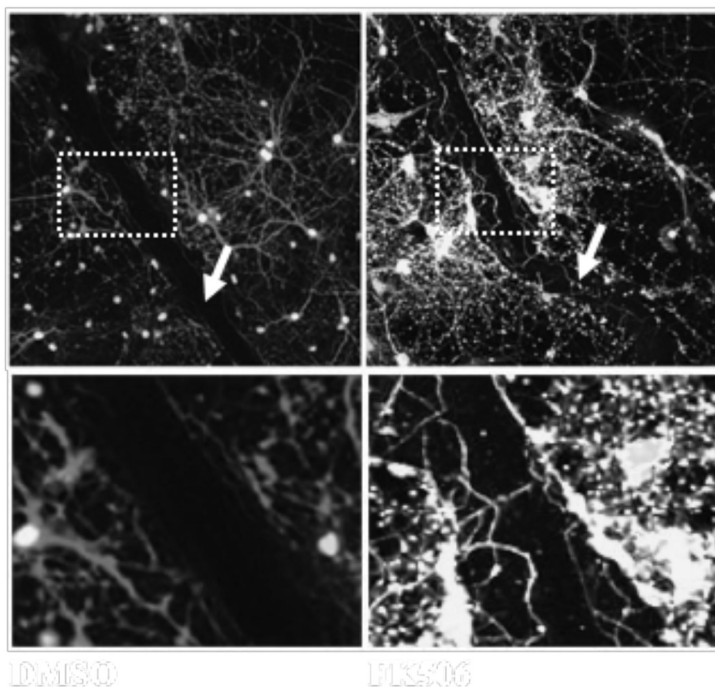


Fig 4. Neuronas hipocámpicas piramidales cultivadas por 19 días se “hirieron” con el extremo de una aguja (flecha). Luego fueron tratadas con FK506 o vehículo (DMSO) por 24 h. El área punteada se amplifica en el panel inferior. Rojo: β III-tubulina. Verde: FKBP52

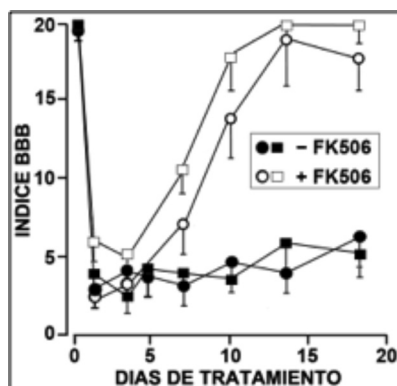


Fig.5. Test BBB de recuperación motora de dos experimentos independientes (cuadrados y esferas, n=4 animales por grupo).

Con el fin de evaluar el efecto de FK506 in vivo, se utilizó el modelo de daño de médula espinal por cirugía a nivel de las vértebras torácicas T8-T10 en ratones. Como consecuencia de la lesión, los animales pierden la motilidad en sus cuartos traseros. La droga FK506 fue inyectada diariamente a una dosis de 3 mg/Kg y la recuperación motora fue semi-cuantificada utilizando el test estándar de *Basso, Beattie & Bresnahan* (o test BBB) [12]. Los resultados se muestran en la Fig.5. Claramente, aquéllos animales tratados con FK506 lograron recuperar su actividad motriz después de dos semanas de tratamiento a valores semejantes a los medidos previos a la lesión generada por cirugía. Los estudios histológicos de la médula espinal (datos no graficados) demostraron una menor reacción inflamatoria en animales tratados con la droga, esto es una menor acumulación de leucocitos y macrófagos, menor activación de células gliales y menor inducción de la enzima óxido-nítrico sintetasa.

DISCUSIÓN

Los recientes hallazgos de nuestro laboratorio han develado un mecanismo hasta hoy desconocido de las IMMs relacionado con la diferenciación neuronal. Como ya se mencionó, es poco lo que sabemos aún sobre el rol biológico de estas proteínas, y esencialmente nada respecto de su función en el tejido nervioso. Como las FKBP se localizan en la heterocromatina de células indiferenciadas, ello podría significar que ejercen un rol silenciador (aún no descrito) sobre genes clave que deben activarse durante la diferenciación para expresar proteínas esenciales del proceso. Esta hipótesis se ve avalada por los resultados mostrados en la Fig. 2.

Por otra parte, la ulterior concentración de estas proteínas en áreas de crecimiento como el terminal axónico presupone un rol de las mismas en la dinámica del citoesqueleto. En otras palabras, pensamos que estamos frente a un hallazgo básico muy relevante en el campo de la neurodiferenciación. De manera importante, los resultados también avalan la hipótesis que el ligando de las IMMs podría ser utilizado con fines regeneradores. Debe remarcar que no existe al presente una terapia eficiente para la regeneración nerviosa [15]; de hecho, los daños suelen ser irreversibles. También es cierto que se desconocen los mecanismos subyacentes al fenómeno. FK506 podría ser una droga útil, pero tiene el indeseado efecto primario para la cual fue creada, FK506 es una droga inmunosupresora. Los estudios presenten

se focalizan en modificar químicamente al macrólido con el fin de obtener derivados desprovistos de actividad inmunosupresora pero que conserven la capacidad neurotrófica.

ABSTRACT

Regulatory effects of FKBP51 and FKBP52 on neurotrophism

High molecular weight immunophilins are soluble proteins first recovered associated to steroid receptors via Hsp90. Even though these proteins share structural domains with low molecular weight immunophilins that are responsible for the immunosuppressive action of certain drugs such as FK506, the biological function of high molecular weight immunophilins remained largely unknown for several years. We provided the first evidence for a biological action when it was demonstrated that these immunophilins favor the retrotransport of steroid receptors and other transcriptional factors.

Inasmuch as immunophilins are highly abundant in the nervous system (10 to 50 times higher expression than in mesodermic tissues), we focused our studies on the properties of these proteins in neurons. When undifferentiated nervous cells were incubated with the immunophilin ligand FK506, their phenotypes became typically neuronal. Biochemical markers accompanied these morphological transformations. The FKBP52-Hsp90-p23 heterocomplex concentrates in a perinuclear structure associated to nuclear lamin. Upon cell stimulation with FK506, this annular structure disassembles and the perinuclear area becomes transcriptionally active. The perinuclear heterocomplex redistributes along the cytoplasm and nascent neurites and microtubules acquired higher filamentary organization. While FKBP52 moves towards neurites and concentrates in arborization bodies and terminal axons, FKBP51 replaces FKBP52 in the perinuclear structure. Importantly, neurite outgrowth is favored by FKBP52 overexpression or FKBP51 knock-down, and is impaired by FKBP52 knock-down or FKBP51 overexpression, indicating that the balance between these FK506-binding proteins plays a key role during the early mechanism of neuronal differentiation. Importantly, *in vivo* assays demonstrated that mice that underwent spinal cord injury by a surgical approach, recover the motor function of their limbs after two weeks of treatment with FK506.

In summary, our results suggest that the immunosuppressive drug FK506 may be used a neurotrophic factor that exerts its biological action via the high molecular weight immunophilin FKBP52.

REFERENCIAS

1. Storer, C.L.; Dickey, C.A.; Galigniana, M.D.; Rein, T.; Cox, M.B., FKBP51 and FKBP52 in signaling and disease. *Trends Endocrinol Metab*, **2011**, 22, (12), 481-490.
2. Li, H.; Rao, A.; Hogan, P.G., Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. *Trends Cell Biol*, **2011**, 21, (2), 91-103.
3. Erlejman, A.G.; Lagadari, M.; Galigniana, M.D., Hsp90-binding immunophilins as a potential new platform for drug treatment. *Future Med Chem*, **2013**, 5, (5), 591-607.
4. Pratt, W.B.; Toft, D.O., Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev*, **1997**, 18, (3), 306-360.
5. Galigniana, M.D.; Erlejman, A.G.; Monte, M.; Gomez-Sanchez, C.; Piwien-Pilipuk, G., The hsp90-FKBP52 complex links the mineralocorticoid receptor to motor proteins and persists bound to the receptor in early nuclear events. *Mol Cell Biol*, **2010**, 30, (5), 1285-1298.
6. Sivils, J.C.; Storer, C.L.; Galigniana, M.D.; Cox, M.B., Regulation of steroid hormone receptor function by the 52-kDa FK506-binding protein (FKBP52). *Curr Opin Pharmacol*, **2011**, 11, (4), 314-319.
7. Galigniana, M.D.; Echeverria, P.C.; Erlejman, A.G.; Piwien-Pilipuk, G., Role of molecular chaperones and TPR-domain proteins in the cytoplasmic transport of steroid receptors and their passage through the nuclear pore. *Nucleus*, **2010**, 1, (4), 299-308.
8. Colo, G.P.; Rubio, M.F.; Nojek, I.M.; Werbach, S.E.; Echeverria, P.C.; Alvarado, C.V.; Nahmod, V.E.; Galigniana, M.D.; Costas, M.A., The p160 nuclear receptor co-activator RAC3 exerts an anti-apoptotic role through a cytoplasmic action. *Oncogene*, **2008**, 27, (17), 2430-2444.
9. Gallo, L.I.; Ghini, A.A.; Piwien-Pilipuk, G.; Galigniana, M.D., Differential recruitment of tetratricopeptide repeat domain immunophilins to the mineralocorticoid receptor influences both heat-shock protein 90-dependent retrotransport and hormone-dependent transcriptional activity. *Biochemistry*, **2007**, 46, (49), 14044-14057.
10. Quintá, H.R.; Maschi, D.; Gomez-Sanchez, C.; Piwien-Pilipuk, G.; Galigniana, M.D., Subcellular rearrangement of hsp90-binding immunophilins accompanies neuronal differentiation and neurite outgrowth. *J Neurochem*, **2010**, 115, (3), 716-734.
11. De Nicola, A.F.; Gonzalez, S.L.; Labombarda, F.; Deniselle, M.C.; Garay, L.; Guennoun, R.; Schumacher, M., Progesterone treatment of spinal

- cord injury: Effects on receptors, neurotrophins, and myelination. *J Mol Neurosci*, **2006**, 28, (1), 3-15.
12. Basso, D.M.; Beattie, M.S.; Bresnahan, J.C., A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*, **1995**, 12, (1), 1-21.
 13. Wilkie, G.S.; Korfali, N.; Swanson, S.K.; Malik, P.; Srsen, V.; Batrakou, D.G.; de las Heras, J.; Zuleger, N.; Kerr, A.R.; Florens, L.; Schirmer, E.C., Several novel nuclear envelope transmembrane proteins identified in skeletal muscle have cytoskeletal associations. *Mol Cell Proteomics*, **2011**, 10, (1), M110 003129.
 14. Weiwad, M.; Edlich, F.; Kilka, S.; Erdmann, F.; Jarczowski, F.; Dorn, M.; Moutty, M.C.; Fischer, G., Comparative analysis of calcineurin inhibition by complexes of immunosuppressive drugs with human FK506 binding proteins. *Biochemistry*, **2006**, 45, (51), 15776-15784.
 15. Thompson, A.K.; Wolpaw, J.R., Operant conditioning of spinal reflexes: from basic science to clinical therapy. *Front Integr Neurosci*, **2014**, 8, 25.

DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DE UNA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL PARA EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA INFECCIÓN POR LOS RETROVIRUS HTLV-1 Y HTLV-2.

Gonzalo M. Castro, Marcos C. Balangero, Eduardo Maturano, Arnaldo Mangeaud, Sandra V. Gallego

Laboratorio de Virus Linfotrópicos - Retrovirus HIV/HTLV, Instituto de Virología Dr. J.M. Vanella, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba

El virus linfotrópico a células T del humano tipo 1 (HTLV-1) es el agente etiológico de la leucemia/linfoma a células T del humano y de la paraparesia espástica tropical (Gessain et al, 1992; Yoshida et al., 1982). El diagnóstico de la infección por este retrovirus humano se basa en la detección de anticuerpos específicos mediante aglutinación de partículas o por técnicas de enzimoimmunoensayo y su posterior confirmación por Western blot (Wb) o inmunofluorescencia indirecta (Gessain, 2011).

Debido a la alta homología en la secuencia de nucleótidos entre los virus HTLV-1 y HTLV-2 pueden ocurrir reacciones cruzadas por las técnicas serológicas (Cann and Chen, 1990), siendo por ello las técnicas moleculares las más adecuadas para diferenciar entre ambos virus. Además, las técnicas moleculares son herramientas muy útiles para definir el diagnóstico de infección en individuos en los que no es posible una definición por serología, clasificados comúnmente como indeterminados.

A diferencia de lo que ocurre en las infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana, las infecciones por HTLV-1 son poco productivas. Esto hace que la transmisión del virus esté sujeta a su asociación a células. Debido a esta característica, el método más adecuado para el diagnóstico molecular es la detección del DNA proviral (DNA viral integrado en los células mononucleares de sangre periférica - PBMCs) por PCR (Cabral et al., 2012; Naderi et al., 2012). Por otro lado, la PCR en tiempo real es el único método que permite la cuantificación del virus presente en muestras clínicas (Altamirano et al., 2010; Lee et al., 2004; Miley et al., 2000). No obstante, actualmente no hay disponibles técnicas comerciales de PCR en tiempo real para la cuantificación del provirus de HTLV-1.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar e implementar una PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de DNA proviral de HTLV-1. La

técnica, una vez validada, fue utilizada para cuantificar el provirus en muestras de células mononucleares de sangre periférica de individuos, sintomáticos y asintomáticos, infectados con HTLV-1.

Las muestras de sangre fueron obtenidas con EDTA y las células fueron separadas mediante gradiente de Ficoll-Hypaque. Se prepararon pellets celulares conteniendo 1×10^6 PBMCs y conservados a -80°C hasta ser utilizados.

La línea celular MT-2, crónicamente infectada y portadora de 2,1 genomas integrados del provirus de HTLV-1 por célula (Albrecht et al., 1998; Cimarelli et al., 1995), fue utilizada para la construcción de una curva de calibración que permitiera calcular el número de copias del provirus de HTLV-1 en las muestras problema. Las células MT-2 contienen además dos copias del gen de albúmina por célula.

Tanto las PBMCs purificadas a partir de las muestras de sangre obtenidas de los individuos infectados con HTLV-1, como los pellets de células MT-2 fueron resuspendidos en 200 μl de buffer fosfato, y el ADN fue extraído utilizando el kit QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen) siguiendo estrictamente las indicaciones del fabricante.

Un nuevo set de primers fue diseñado teniendo en cuenta las secuencias de las variantes del virus que circulan en nuestro país, previamente descritas por nuestro grupo de trabajo (accession numbers: DQ227128-DQ227191), utilizando el software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems). El primer forward, HTLV-1F1 (5'-GCCCTAATAATTCTACCCGAAGACT-3'), y el primer reverse, HTLV-1R1 (5'-GGTTGAGTGGAACGGAAGGA-3'), fueron seleccionados para amplificar una región altamente conservada del gen *tax* del virus HTLV-1. La secuencia de ambos primers fue comparada con la base de datos del GenBank, a través de la herramienta BLAST (Altschul et al., 1997), para evaluar la especificidad de los mismos.

Para detectar y cuantificar las copias del provirus de HTLV-1 integradas en el genoma celular, se realizaron dos curvas de estándares: una curva estándar para HTLV-1 para calcular el número de copias del virus, y otra usando el gen de albúmina, para determinar la cantidad de ADN celular presente en la muestra. El gen de albúmina fue utilizado también como referencia endógena para normalizar las variaciones en el recuento de PBMCs o en la extracción de ADN; y para detectar la presencia de inhibidores en la reacción de amplificación. Los primers utilizados para la amplificación y cuantificación de un fragmento del gen de albúmina (Alb-F y Alb-R), fueron previamente descritos por Lizée et al., 2003.

El gen de albúmina fue amplificado en paralelo al gen *tax* de HTLV-1 para cuantificar el número de copias de células y el de provirus, respectivamente. La amplificación y la obtención de los datos se realizó utilizando el equipo ABI 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems).

Para ambos genes, las curvas de estándares fueron aceptadas cuando los valores de las pendientes estaban entre -3,59 y -3,10, correspondiendo a eficiencias de amplificación de la PCR entre 90% y 110%. El rango dinámico del ensayo abarca por lo menos 5 órdenes de magnitud con una correlación lineal fuerte ($r \geq 0.992$).

Fueron realizados experimentos para determinar la especificidad y la sensibilidad de la PCR en tiempo real desarrollada utilizando SYBR green. Los ensayos de especificidad fueron realizados utilizando muestras de sangre infectadas con otros virus con genoma a ADN y/o a ARN. Se obtuvieron y ensayaron muestras de sangre provenientes de 25 individuos seronegativos para HTLV-1. De ellos, 10 eran infectados con HIV-1, 3 eran infectados con HBV, 3 con HCV y 2 con HTLV-2 (confirmados por PCR). Las líneas celulares 8E5 infectada con HIV-1, MO-T infectada con HTLV-2, y la línea linfoblastoide no infectada MOLT-3, fueron utilizadas también para los ensayos de evaluación de especificidad. Todas las líneas celulares ensayadas al igual que las muestras correspondientes a los individuos seronegativos para HTLV-1 con o sin infección con los demás virus mencionados anteriormente, resultaron negativas por la técnica de PCR en tiempo real desarrollada, utilizando los primers HTLV-1F1 y HTLV-1R1. Esto resultó en una especificidad del 100%.

La sensibilidad de la técnica fue evaluada con diluciones de ADN entre 1 y 5 copias del gen *tax* de HTLV-1, ensayadas en sucesivas replicas. Los resultados fueron evaluados utilizando un análisis PROBIT (tasa de detección de 95%) utilizando el software R (R Project, versión 2.13.2). Los resultados obtenidos indican un límite de detección de 2,97 copias, con un rango entre 1,05 y 3,93 copias, para un límite de confianza del 95%.

Se evaluó también la reproducibilidad intra e inter-ensayo. Se obtuvieron las medias de los valores de ciclo umbral (Ct) y CV% para cada dilución de las células MT-2, tanto para el gen *tax* de HTLV-1 como para el gen de albúmina. En particular, la reproducibilidad intra-ensayo se determinó evaluando diez réplicas de cada punto de las diluciones seriadas entre 10 y 10 copias. El coeficiente de variación de los Ct fue $<0,75\%$ para todas las diluciones ensayadas. La reproducibilidad inter-ensayo se determinó analizando cinco ensayos diferentes en los que cada dilución fue evaluada por triplicado. Los resultados mostraron un CV para los Ct $<1,70\%$ para todas las diluciones del

gen tax y del gen de albúmina analizadas. Valores de CV <3% y <10% se consideran aceptables para la reproducibilidad intra-ensayo e inter-ensayo, respectivamente (Moens et al., 2009).

Finalmente, con el objetivo de evaluar la performance de la PCR en tiempo real desarrollada, se estudiaron 40 muestras de sangre de individuos seropositivos para HTLV-1. Fueron incluidas en el estudio muestras de pacientes con TSP/HAM y muestras de individuos asintomáticos provenientes del norte de Argentina. El criterio para la definición de caso fue el descripto previamente por De Castro-Costa et al., 2006.

Utilizando esta metodología fue posible detectar el ADN proviral en todas las muestras, y la carga proviral obtenida fue de $2,2 \times 10^3$ a más de $8,3 \times 10^5$ copias/10 PBMCs.

En conclusión, la técnica de PCR en tiempo real utilizando SYBR Green permitió la amplificación y cuantificación simultánea del ADN proviral de HTLV-1, evitando la manipulación de productos de PCR. Esto reduce el riesgo de contaminación, y permite el procesamiento de un mayor número de muestras, en menor tiempo que por PCR convencional. Cuando esta técnica se utiliza para la cuantificación del ADN proviral de HTLV-1, tiene un amplio rango dinámico, de 5 órdenes de magnitud, mostrando una fuerte correlación lineal entre el número de ciclos y el número inicial de copias del virus. Estos resultados muestran que la PCR en tiempo real desarrollada y validada en el presente trabajo es una herramienta adecuada para la detección y cuantificación de variantes del virus HTLV-1, incluyendo las prevalentes en Argentina. Además, podrá ser utilizada para futuros estudios que permitan clarificar la relación existente entre la carga proviral y la patogénesis de la infección.

ABSTRACT

A quantitative real-time PCR (qPCR) assay using SYBR Green dye was established in order to detect and quantify the proviral DNA of HTLV-1 in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Primers were designed, and the assay was standardized to amplify a novel, conserved HTLV-1 tax region. Proviral load was normalized to the amount of cellular DNA by quantitation of the human albumin gene. Firstly, the qPCR was assessed determining the specificity, sensitivity, dynamic range and intra- and inter-assay reproducibility of the technique. The limit of detection as determined by PROBIT analysis using dilutions of the standard was 2.97 copies. The assay had an excel-

lent dynamic range from 105 to 101 copies per reaction and good intra- and inter-assay reproducibility, CVs less than 2%. Secondly, the performance of the qPCR was tested on 40 HTLV-1 seropositive individuals. Proviral load for HTLV-1 carriers ranged from 2.2×10^2 to more than 8.3×10^4 copies/106 PBMCs. The high sensitivity and wide dynamic range allowed the determination of a broad range of HTLV-1 proviral loads in infected individuals. This assay is a valuable alternative diagnostic tool when current available serological assays are insufficient. In addition, it will facilitate the study of the relationship between proviral load and pathogenesis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Albrecht, B., Collins, N.D., Newbound, G.C., Ratner, L., Lairmore, M.D. 1998. Quantitation of human T cell lymphotropic virus type 1 proviral load by quantitative competitive polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods.* 75, 123–140.
2. Altamirano, N.A., Rocco, C., Aulicino, P., Sen, L., Mangano, A., 2010. Quantitation of HTLV-I proviral load by a real-time PCR assay using SYBR Green: Comparison of two methods for DNA isolation. *J. of Virol. Meth.* 170, 160–164
3. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
4. Cabral, F., Arruda, L.B., de Araújo, M.L., Montanheiro, P., Smid, J., de Oliveira, A.C., Duarte, A.J., Casseb, J., 2012. Detection of human T-cell lymphotropic virus type 1 in plasma samples. *Virus Res.* 163, 87-90.
5. Cann, A., Chen, I., 1990. Human T cell leukemia virus types I and II. In BN Fields, *Virology*, Raven, New York.
6. Cimarelli, A., Duclos, C.A., Gessain, A., Cattaneo, E., Casoli, C., Biglione, M., Mauciere, P., Bertazzoni, U., 1995. Quantitation of HTLV-II proviral copies by competitive polymerase chain reaction in peripheral blood mononuclear cells of Italian injecting drug users, central Africans, and Amerindians. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 10, 198–204.
7. De Castro-Costa, C.M., Araujo, A.Q., Barreto, M.M., Takayanagui, O.M., Sohler, M.P., da Silva, E.L., de Paula, S.M., Ishak, R., Ribas, J.G., Rovi-

- rosa, L.C., Carton, H., Gotuzzo, E., Hall, W.W., Montano, S., Murphy, E.L., Oger, J., Remondegui, C., Taylor, G.P., 2006. Proposal for diagnostic criteria of tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/ HAM). *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 22, 931–935.
8. Gessain, A., 2011. Human retrovirus HTLV-1: descriptive and molecular epidemiology, origin, evolution, diagnosis and associated diseases. *Bull Soc Pathol Exot.* 104,167-80.
 9. Gessain, A., Gout, O., 1992. Chronic myelopathy associated with human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Ann. Intern. Med.* 117, 933-946.
 10. Lee, T.H., Chafets, D.M., Busch, M.P., Murphy, E.L., 2004. Quantitation of HTLV-I and II proviral load using real-time quantitative PCR with SYBR Green chemistry. *J. Clin Virol.* 31, 275-82.
 11. Lizée, G., Aerts, J., Gonzales, M., Chinnasamy, N., Morgan, R., Topalian, S., 2003. Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction as a Method for Determining Lentiviral Vector Titers and Measuring Transgene Expression. *Hum. Gene Ther.* 14, 497-507.
 12. Miley, W.J., Suryanarayana, K., Manns, A., Kubota, R., Jacobson, S., Lifson, J.D., Waters, D., 2000. Real-time polymerase chain reaction assay for cell-associated HTLV type I DNA viral load. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 16, 665-675.
 13. Moens, B., López, G., Adaui, V., González, E., Kerremans, L., Clark, D., Verdonck, K., Gotuzzo, E., Vanham, G., Cassar, O., Gessain, A., Vandamme, A., Van Dooren, S., 2009. Development and Validation of a Multiplex Real-Time PCR Assay for Simultaneous Genotyping and Human T-Lymphotropic Virus Type 1, 2, and 3 Proviral Load Determination. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3682–3691.
 14. Naderi, M., Paryan, M., Azadmanesh, K., Rafatpanah, H., Rezvan, H., Mirab Samiee, S., 2012. Design and development of a quantitative real time PCR assay for monitoring of HTLV-1 provirus in whole blood. *J. Clin. Virol.* 53, 302-307.
 15. Yoshida, M., Miyoshi, I., Hinuma, Y., 1982. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 79, 2031-2035.

LOS ANTIPSICÓTICOS Y EL DESARROLLO DE DIABETES: ESTUDIO EN DOS MODELOS EXPERIMENTALES DEFICIENTES EN EL RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D2.

Dra Isabel A. García Tornadu
Instituto de Biología y Medicina Experimental.

SÍNTESIS FINAL

La glucosa es la principal fuente de energía nutricional para las neuronas, con un requerimiento continuo de abastecimiento. En su ausencia las neuronas mueren, por lo que la homeostasis de la glucosa con la regulación constante de la concentración en el fluido extracelular resulta vital.

El páncreas endocrino es el órgano que sintetiza y libera las hormonas principales involucradas en la homeostasis de la glucosa: insulina, hormona hipoglucemiante y glucagón, hormona hiperglucemiante.

Un ineficaz control en la síntesis o secreción de insulina, así como también una insensibilidad a la misma conducen a estados patológicos de hiperglucemia, dando lugar a la diabetes. Si bien la diabetes es definida por el estado de hiperglucemia, es de hecho una enfermedad metabólica multifactorial, considerando las numerosas vías en la cual la glucosa se encuentra asociada. Su etiología es múltiple y variada, incluyendo factores genéticos, ambientales, y los factores considerados sociales, como el estilo de vida, estatus social, etc.

En los últimos 8 años se demostró que existe una estrecha relación entre el uso de drogas antipsicóticas y el desarrollo de diabetes. El tiempo del tratamiento, y la selectividad de la droga son factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad. El sistema dopaminérgico estaría relacionado con los mecanismos que regulan la secreción de insulina. En trabajos previos de laboratorio demostramos que animales que carecen del receptor dopaminérgico D2, tienen alteraciones en la homeostasis de la glucosa, presentando niveles muy reducidos de secreción de insulina. El objetivo de este trabajo fue profundizar el mecanismo de acción de insulina en los tejidos periféricos, utilizando modelos animales tanto farmacológicos como transgénicos. Demostramos que los animales *knock out* para el receptor D2 no

presentan alteraciones en los componentes de la cascada de señalización a las dosis estudiadas de 1 UI o 10 UI de insulina para los tejidos hepático, adiposo y músculo esquelético. Los niveles de fosforilación de AKT en función del tiempo aumentaron, pero sin encontrar diferencias significativas entre genotipos. Por otra parte evaluamos los niveles de expresión hepática de las enzimas Glucokinasa, y de los factores de transcripción de Srebp y Chrebp. Demostramos que en los animales KO, luego de una inyección de insulina hepática, los niveles de glucokinasa y Chrebp mensajeros se encuentran aumentados significativamente en los animales transgénicos respecto al control. Concluimos que si bien no encontramos diferencias en la cascada de señalización de insulina, los mayores niveles del mensajero de glucokinasa y Chrebp en el hepatocito estarían relacionados con una mayor sensibilidad a la insulina.

En segunda instancia, estudiamos la sensibilidad a la insulina y la función del receptor D2 utilizando dos modelos farmacológicos: haloperidol, antagonista D2, cabergolina agonista D2 que no atraviesa la barrera hemoencefálica. El objetivo era poder estudiar las diferentes contribuciones de los receptores tanto centrales como periféricos de D2.

Un test de tolerancia a la glucosa demostró una intolerancia a la misma en ambos modelos farmacológicos, respecto al mismo control. No encontramos alteraciones en la sensibilidad a la insulina en estos modelos.

A nivel hepático, profundizamos el estudio de la sensibilidad a insulina en este tejido.

Los niveles de glucógeno hepático fueron significativamente menores en el tratamiento con haloperidol. Este resultado se correlacionó con mayores niveles del mensajero Srebp. Estos resultados sugieren un efecto de resistencia a la insulina en este tejido con este tratamiento.

Por otra parte encontramos que los niveles del mensajero glucokinasa estaban aumentados en el tratamiento con cabergolina.

Nuestros resultados indican que un tratamiento con haloperidol estaría produciendo efectos finales de resistencia a la insulina a nivel hepático, mientras que el tratamiento con cabergolina tendría un efecto sensibilizante. El tratamiento con haloperidol activaría el eje gluco-hepato-secretor, contribuyendo al desarrollo de una resistencia a la insulina. El uso prolongado de antagonistas dopaminérgicos promovería una mayor liberación de insulina frente al estímulo de glucosa, y por tanto un estado de hiperinsulinemia que podría derivar en un estado patológico de resistencia a insulina. Por otra parte los receptores dopaminérgicos del sistema nervioso central, especifi-

camente en los núcleos hipotalámicos, activarían el eje hepático para una mayor degradación de glucógeno y una mayor síntesis lipídica, efecto que contribuiría a la esteatosis asociada a los tratamientos con antipsicóticos.

Por otra parte la cabergolina sólo tendría efecto a nivel periférico sobre los receptores de DA del islote, produciendo una inhibición de los mismos para la secreción de insulina. Este efecto produciría el aumento a la sensibilidad de insulina en la periferia. Los tratamientos con agonistas dopaminérgicos en personas con diabetes, inhibirían la secreción exacerbada de insulina, promoviendo que a nivel hepático se produzca una mayor sensibilidad a la insulina.

Nosotros postulamos que existe un componente dopaminérgico que regularía la sensibilidad a la insulina. Los resultados obtenidos son alentadores y queremos continuar estudiando los mecanismos moleculares por los cuales la dopamina a través de su receptor D2 participa en forma activa en la homeostasis de la glucosa.

ABSTRACT

Glucose is the main source of energy for neurons, with continuous supply nutritional requirement. Therefore glucose homeostasis becomes a vital process. The endocrine pancreas is the organ that synthesizes and releases the main hormones involved in glucose homeostasis: insulin, the hypoglycemic hormone and glucagon, a hyperglycemic hormone.

An ineffective control on insulin secretion or insulin action causes an increase in circulating glucose concentrations and the disease diabetes mellitus (DM). Although DM is defined by the state of hyperglycemia, it is indeed a multifaceted metabolic disease considering the many ways in which glucose is associated. Its etiology is multiple and varied.

In the past 8 years it has been shown that there is a close relation between antipsychotic drug treatment and the development of DM. The dopaminergic system would be related to the mechanisms that regulate insulin secretion. In previous works we demonstrated that animals lacking dopamine D2 receptor (D2R) have impaired glucose homeostasis with a decreased insulin secretion. The aim of this study was to understand the mechanism of action of insulin in peripheral tissues and the dopaminergic system using transgenic animals and pharmacological models. We showed that D2R knock out (KO) animals did not present alterations in insulin signaling cascade in the liver, skeletal

muscle and adipose tissue. We evaluated the hepatic expression levels of the enzyme glucokinase, and the levels of ChREBP and SREBP transcription factors. After an injection of insulin, KO animals had significantly increased glucokinase and ChREBP messengers compared to wild type animals. We conclude that, although there is no difference in the insulin signaling cascade, higher levels of glucokinase messenger and ChREBP in hepatocytes would be related to increased insulin sensitivity.

We also studied insulin sensitivity and D2R function using two pharmacological models: the D2 antagonist haloperidol and the D2 agonist cabergoline. Cabergonilina does not cross the blood barrier. The aim was to study the different contributions of both central and peripheral D2Rs. Increased SREBP messenger and decreased glucogen levels were found with the haloperidol treatment. On the other hand, cabergoline produced an increase in glucokinase and ChREBP messenger levels, suggesting an increase in insulin sensitivity in this tissue.

We postulate that dopamine can regulate insulin action at peripheral tissues. These preliminary results are encouraging and future studies will be focused on the molecular mechanisms by which dopamine participates actively in glucose homeostasis through its D2R.

EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL AL ETANOL SOBRE EL BALANCE HIDROSALINO: CARACTERIZACIÓN DEL SUSTRATO NEUROANATÓMICO"

Godino, María Andrea del Milagro; Molina, Juan Carlos
Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra
(INIMEC-CONICET-Universidad Nacional de Córdoba)

El Síndrome de alcoholismo fetal es una condición caracterizada por anomalías faciales, restricción del crecimiento y desórdenes del neurodesarrollo que afecta de 0,2 a 1,5/1000 infantes. Sin embargo otras consecuencias menos severas producidas por la exposición prenatal a etanol son 3 veces más frecuentes. Los efectos de la exposición prenatal al alcohol se relacionan principalmente con la cantidad de la droga administrada y el periodo de la gestación donde ocurre la exposición. En nuestros trabajos previos hemos observado que la administración repetida de dosis bajas o moderadas de etanol (1-2 g/kg) en hembras preñadas (días gestacionales 17 al 20) provoca un incremento en la ingesta de alcohol en la infancia y la adolescencia. Estos niveles de exposición al etanol han sido considerados como "seguros" desde el punto de vista teratogénico, sin embargo cada vez hay más evidencias que pueden tener efectos negativos en algún orden funcional a lo largo de la vida de un organismo. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la exposición de dosis moderadas de etanol (2gr/kg) durante los días gestacionales 17-20 sobre el balance hidrosalino, en particular sobre la ingesta de sodio inducida por una depleción de sodio corporal (DS). Además nos propusimos caracterizar el sustrato neuroanatómico que subyace a estos efectos.

Se utilizaron ratas Wistar. Las hembras preñadas recibieron durante los días gestacionales 17 al 20 una inyección intragástrica diaria de etanol (2 g/kg) (pre-EtOH) o un volumen equivalente de agua (0 g/kg) (pre-agua). En este caso el modelo utilizado para generar la depleción de sodio (DS) es la administración de Furosemida (diurético y natriurético) combinada con una dieta baja en sodio por 24hs. El modelo de ingesta utilizado es un modelo de consumo voluntario (NaCl 2% vs agua).

Se observó un mayor consumo de espontáneo e inducido por la DS de etanol 3% en los animales que habían tenido contacto prenatal con el alcohol. No observamos diferencias significativas entre los grupos Pre-EtOH y

Pre-AGUA en el consumo espontáneo y voluntario de NaCl 2%, agua o en la ingesta total de fluidos. En relación al consumo de sodio inducido por DS, el factor DS produce un aumento significativo en el consumo de NaCl 2% comparado con los niveles basales, pero no se observan diferencias significativas en el consumo inducido de NaCl 2% en relación al tratamiento prenatal, aunque si podemos destacar que existe una tendencia en los animales Pre-EtOH a consumir menos NaCl 2%. En relación al consumo de agua hay un aumento significativo en el consumo de agua luego de la DS en relación a los niveles basales, esto no es sorprendente ya que en estos modelos de DS luego de la ingesta de sodio se produce ingesta de agua para reestablecer la volemia y el espacio extracelular, pero además observamos una reducción significativa en el consumo de agua en los animales Pre-EtOH. En conjunto estos resultados estarían sugiriendo que existe una respuesta conductual compensatoria menor en relación al grupo Pre-AGUA. Paralelamente se corrieron controles que tuvieron acceso a agua y sucrosa 10% o a agua en los tubos, no se observaron en estos casos ninguna diferencia en la ingesta espontánea ni inducida entre los grupos Pre-EtOH y Pre-AGUA. Esta diferencia en la ingesta de agua podría reflejar una respuesta renal inducida por la droga Furosemida. Por ese motivo luego analizamos la respuesta renal. El efecto de furosemida (depletado de sodio) no difiere entre los grupos Pre-EtOH y Pre-AGUA, ya que tanto la concentración urinaria de sodio y de potasio como el volumen urinario son iguales en los grupos depletados. Sin embargo, observamos que la concentración de sodio y potasio basal si difieren en relación a la exposición prenatal, siendo menor en Pre-EtOH. Además, la correlación existente entre el volumen urinario y la ingesta de agua inducida por el tratamiento con Furosemida son significativamente distintos entre los animales pre-EtOH y pre-AGUA. Es decir que los animales Pre-EtOH no solo tienen menor habilidad para conservar el agua renal, sino que además consumen menos agua luego de una depleción de sodio. Con lo cual nos propusimos analizar el posible sustrato neuroanatómico de estas alteraciones hidroelectrolíticas generados por el tratamiento prenatal con etanol. Para esto utilizamos la técnica inmunohistoquímica que nos permitió la detección de una proteína de la familia de Fos, Fra, que es un indicador de activación neuronal a largo plazo. La expresión de este marcador nos permitió evaluar el efecto del tratamiento prenatal con etanol en las crías PN28-30 en las estructuras correspondientes a la lamina terminalis, al complejo de la amígdala extendida y en los sistemas oxitocinérgicos y vasopresinérgicos hipotalámicos centrales. El número de neuronas inmunoreactivas

a Fra no difiere significativamente entre los animales Pre-AGUA y Pre-EtOH en ninguno de los núcleos correspondientes a la lámina terminalis: órgano subfornical (SFO), órgano vascular de la lámina terminalis (OVLT) y núcleo preóptico mediano (MnPO). Se observó una mayor activación en el núcleo de la amígdala central y en el núcleo bed de la estría terminalis en su porción laterodorsal correspondientes a la amígdala extendida central en los animales prenatalmente expuestos a etanol. Además, no se observó diferencias en la doble marcación de Fra y oxitocina a nivel del SON y ni en las subdivisiones magnocelulares del PVN. Sin embargo en relación al sistema vasopresinérgico observamos un incremento en la marcación de Fra en las neuronas AVP correspondiente a las subdivisiones magnocelulares PaMM ($p=0,03$) y PaLM ($p=0,04$) del núcleo Paraventricular.

En resumen, el tratamiento prenatal con etanol aumenta el consumo espontáneo e inducido de la droga y no modifica el consumo espontáneo ni inducido de NaCl 2% durante la adolescencia. Aportando nueva evidencia a la mayor predisposición que genera el contacto prenatal con etanol a su posterior consumo durante la adolescencia en un modelo de dos tubos donde no está restringida el agua. El estudio del sustrato neuroanatómico indicaría que posiblemente parte de la mayor predisposición al consumo de etanol esté mediada por las estructuras correspondientes al complejo de la amígdala extendida central que median respuestas de miedo y ansiedad. Por otra parte, el tratamiento Pre-EtOH disminuye en las crías no sólo el consumo de agua inducido por una depleción de sodio corporal, sino que además presentan una habilidad a nivel renal menor para concentrar la orina en estado basal, lo que estaría indicando que presentan alguna alteración fisiológica a la hora de regular el balance hidroelectrolítico. Estas respuestas posiblemente estén moduladas por la activación crónica del sistema vasopresinérgico a nivel del núcleo paraventricular hipotalámico.

ABSTRACT

The aim of the present work was to analyze the effect of prenatal exposure to moderate doses of ethanol (Pre-EtOH) during the gestational days (GD) 17 to 20 on offspring (postnatal day 28-33) hydroelectrolyte balance. We analyzed basal brain neural activity and basal/induced sodium appetite and renal response stimulated by sodium depletion (SD). Wistar pregnant dams received one daily intragastric administration of 0 or 2 g/kg/ml. SD was induced

by Furosemide and low sodium diet treatment (FURO +LSD). Another group was submitted to immunohistochemical detection of Fra like (Fra-LI-ir) protein and oxytocin (OT) and/or vasopressin (AVP). Prenatal ethanol exposure (Pre-EtOH group) increased the spontaneous and induced ethanol 3% intake and reduced water intake induced by Furo + LSD in the offspring but did not affect induced sodium consumption. The sodium and potassium urine basal concentration were reduced in Pre-EtOH pups and we did not find any differences in renal responses during FURO treatment. However, the correlation between urinary volume and water intake induced by FURO was significantly different between Pre-EtOH and control. At brain level the number of Fra-LI immunoreactivity was significantly increased in central extended amygdala nuclei and in AVP magnocellular neurons of Paraventricular nucleus (PVN) in Pre-EtOH pups. We did not observe any differences in Fra-LI positive cells along the lamina terminalis and OT hypothalamic cells. In summary, prenatal ethanol exposure increased ethanol consumption during adolescence possibly mediate by extended amygdala complex. Also, early ethanol exposure alters hydromineral balance regulation, since decreased the induced water intake and baseline urinary sodium and potassium concentration, suggesting a reduced capacity to retain body water. These responses are possibly modulated by the chronically increased activity of PVN AVP neurons.

MECANISMOS CELULARES IMPLICADOS EN EL MANTENIMIENTO DE LA INTEGRIDAD CROMOSÓMICA FRENTE A LOS VENENOS DE ADN TOPOISOMERASA II α

González Cid Marcela Beatriz

Laboratorio de Mutagénesis. Instituto de Medicina Experimental, CONICET-
Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires

INTRODUCCIÓN

Las ADN topoisomerasas II (topoII) participan en funciones metabólicas que afectan la topología del ADN: replicación, transcripción y organización cromosómica, introduciendo rupturas transitorias en la doble cadena del mismo (Nitiss, 2009). La isoforma α de topoII es esencial para las células proliferantes alcanzando su máximo nivel proteico durante la fases G2/M (Deweese y Osheroff, 2009). Las drogas quimioterapéuticas Idarubicina (IDA) y Etopósido (ETO) funcionan como venenos de topoII al estabilizar los complejos ADN-topoII y prevenir la religación de los extremos rotos originando rupturas de doble cadena (RDC) persistentes (McClendon y Osheroff, 2007). Las RDC son lesiones críticas que afectan la estabilidad del genoma debido a que pueden llevar a rearreglos cromosómicos y promover procesos tumorigénicos o conducir a la muerte celular. Teniendo en cuenta la elevada frecuencia de neoplasias secundarias inducidas en pacientes tratados con venenos de topoII (Leone, 2010), la forma en que estas lesiones son reparadas cobra gran relevancia.

Las células de mamíferos poseen dos mecanismos principales de reparación: recombinación homóloga (HR) y reunión de extremos no homólogos (NHEJ) para evitar que las RDC se perpetúen. NHEJ repara las RDC a lo largo del ciclo celular reuniendo los extremos de ADN rotos sin restaurar la secuencia nucleotídica alrededor de la lesión (Lieber, 2010) y HR utiliza una molécula de ADN homóloga no dañada para restaurar la información original durante las fases S tardía/G2 (Jeggo, 2011). En NHEJ participa DNA-PKcs (subunidad catalítica de la proteína quinasa relacionada al ADN) y se definió a esta vía D-NHEJ. Cuando DNA-PKcs está mutada o inhibida químicamente, las células utilizan una vía alternativa que opera como backup de NHEJ, B-NHEJ, cuya actividad se incrementa durante la fase G2 (Iliakis, 2009).

El presente trabajo propone determinar la contribución de D-NHEJ en el mantenimiento de la integridad cromosómica frente a los venenos de topolli DA o ETO en células de mamíferos tratadas en la fase G2.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares y tratamientos

Líneas celulares de hámster chino CHO9 (fibroblastos de ovario) y su línea derivada XR-C1, deficiente en DNA-PKcs, se cultivaron en medio F-12. La línea celular humana HeLa (carcinoma cérvico-uterino) se cultivó en medio RPMI 1640. Ambos tipos celulares se suplementaron con suero fetal bovino (SFB) 10%, L-glutamina 1mM, penicilina (100U/ml) y estreptomicina (100µg/ml) (medio completo). Los cultivos se mantuvieron en estufa a 37°C con CO2 5% en atmósfera húmeda. Las células se trataron con los venenos de topolli DA o ETO durante 1h. La línea celular Hela se pretrató con el inhibidor químico de la actividad quinasa de DNA-PKcs, NU7026 10µM. Los cultivos celulares controles se expusieron a dimetil-sulfóxido (DMSO) diluyente de ETO.

Cinética de reparación de RDC (detección de la forma fosforilada de la histona H2AX, γH2AX)

Células de hámster chino CHO9 y XR-C1 se sembraron en placas de Petri de 60mm, se trataron con DA 0,005µg/ml o ETO 5,0µg/ml y se cosecharon inmediatamente para ETO o luego de 2hs para DA o se dejaron en cultivo con medio completo por 24hs. Las células se lavaron con PBS, tripsinizaron, fijaron en paraformaldehído (PFA) 1% durante 10min a

37°C y permeabilizaron con Tritón X-100 0,25%. Las muestras se resuspendieron en 100µl de buffer de incubación (3% SFB y 0,25% Tritón X-100) durante 30min a 37°C y luego, se incubaron en buffer conteniendo el anticuerpo anti-γH2AX (1:800) durante 18hs a 4°C. Se resuspendieron en 100µl de buffer de incubación conteniendo el anticuerpo secundario (FICT, 1:100) por 30min en oscuridad a temperatura ambiente. Se efectuó un control de isotipo para la detección del marcado inespecífico incubando un cultivo sin tratar con el anticuerpo secundario anti-ratón (1:100) sin la presencia del anticuerpo primario. Las muestras se lavaron en PBS y a 100µl se adicionó iodo de propidio 10µg/ml incubando durante 15min en oscuridad con RNasa A 150µg/ml. La adquisición de 20.000 células por muestra se realizó mediante un citómetro de flujo utilizando el software FACScan.

Aberraciones cromosómicas (AC) estructurales e índice mitótico (IM)

Las células sembradas en placas de Petri de 60mm se acumularon en el borde G1/S mediante timidina (hámster) o timidina y afidicolina (células humanas), se lavaron con PBS y se agregó medio completo libre de timidina o afidicolina durante el tiempo necesario para alcanzar la fase G2 del ciclo celular. Se analizó la acumulación de células en esta fase por citometría de flujo. Las células en G2 se trataron con los venenos de topolli, se lavaron con PBS y se mantuvieron en medio completo durante 4-6hs para analizar las AC en la primera mitosis luego del tratamiento. Se agregó colchicina 0,2µg/ml durante los últimos 90min de cultivo, las células se tripsinizaron, se resuspendieron en solución hipotónica (KCl 0,075M), se fijaron en metanol: ácido acético (3:1) y colorearon con Giemsa 10% durante 2,5-4min. Las rupturas cromatídicas y figuras de intercambio cromatídico se evaluaron en 50-100 metafases por tratamiento. El índice mitótico se determinó contando las metafases presentes en 1.000-2.000 núcleos interfásicos por tratamiento. Las experiencias se realizaron por triplicado.

Inducción de micronúcleos (MN) en células G1 posmitóticas

Las células sembradas sobre cubreobjeto en placas de Petri de 35mm, se trataron en la fase G2 con los venenos de topolli, se lavaron con PBS y se mantuvieron en medio completo durante 8-10hs para llegar a la interfase siguiente al tratamiento (G1 posmitótica). En las células HeLa se agregó citocalasina B 3µg/ml (inhibidor de la citocinesis) durante las últimas 4hs de cultivo para obtener células binucleadas. Las células se fijaron con PFA 2% y se permeabilizaron con 0,25% de Tritón X-100 a temperatura ambiente. Luego del bloqueo (3% BSA con 0,25% Tritón X-100), las células se incubaron durante 18hs a 4°C en solución bloqueante conteniendo el anticuerpo anti γH2AX (1:100), se lavaron con PBS y se incubaron por 1h con solución bloqueante conteniendo el anticuerpo secundario (Dye Light 488, 1:200). Finalmente, se procedió a montar los cubreobjetos en portaobjetos utilizando 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) como contra-colorante conteniendo medio de montaje. Se analizaron los MN presentes en 1.000 núcleos por tratamiento en células de hámster CHO9 y XR-C1 o la presencia de γH2AX en los MN y en los núcleos principales en 500 células binucleadas y el porcentaje de células binucleadas en 1.000 células por tratamiento en las células HeLa. Las experiencias se realizaron por triplicado.

RESULTADOS

La evaluación de la cinética de reparación de las RDC inducidas por el envenenamiento de topoli se realizó en células de hámster chino proficientes y deficientes en D-NHEJ (Figura 1). Las células XR-C1 presentaron un nivel incrementado de daño en el ADN a las 24hs posteriores al tratamiento (PT).

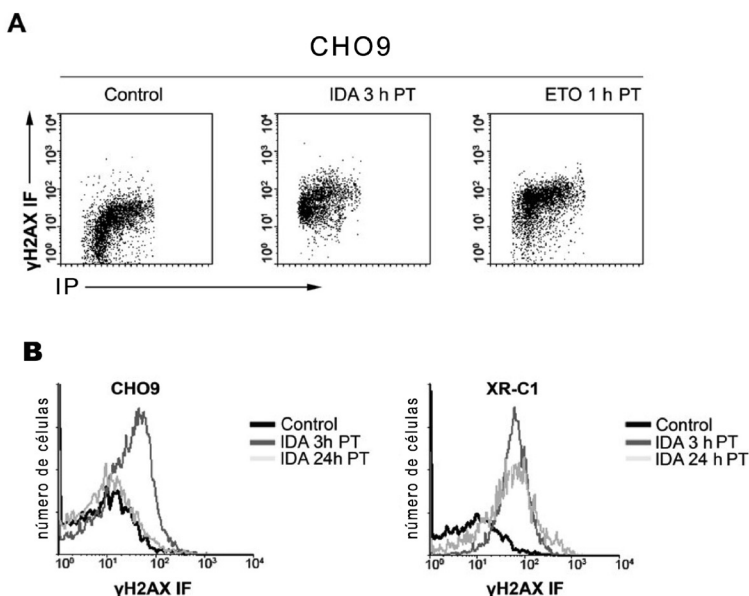


Figura 1. Reparación de RDC (γ H2AX) en células de hámster chino. (A) Gráfico representativo del máximo nivel de inducción de γ H2AX por IDA 0,005 μ g/ml a 3hs PT o por ETO 5,0 μ g/ml a 1h PT en la línea proficientes CHO9. (B) Histogramas representativos de γ H2AX a diferentes tiempos para IDA en CHO9 y en la línea deficiente en DNA-PKcs, XR-C1.

La persistencia de estas RDC en el ADN puede originar AC estructurales por una reparación incorrecta y/o por permanecer sin reparar (Durante, 2013). Se analizaron las AC, rupturas e intercambios cromatídicos, inducidas por venenos de topoli en la fase G2 de células de hámster chino (Figura 2A) y de células humanas HeLa (Figura 2B).

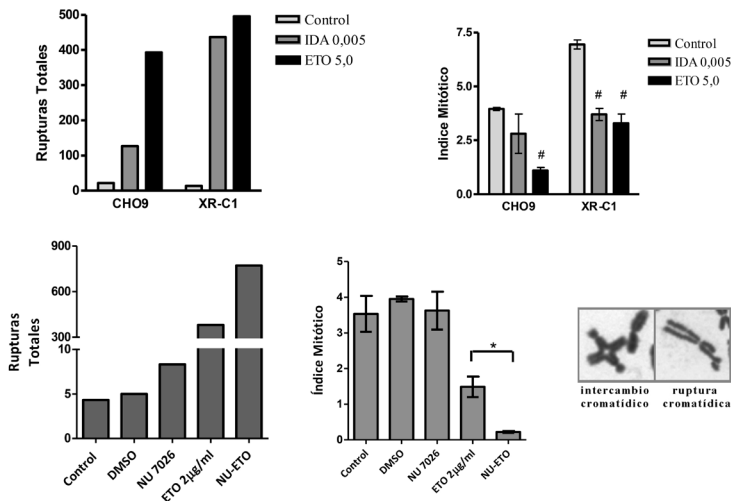


Figura 2. Aberraciones cromatídicas e índice mitótico en células de hámster chino (A) y células HeLa (B) tratadas en G2. Las rupturas totales se calcularon considerando las rupturas cromatídicas como una unidad y los intercambios cromatídicos como dos unidades.

Test t de Student: # $p < 0,01$ vs. controles respectivos; * $p < 0,0001$ entre ETO y NU7026-ETO.

La deficiencia de DNA-PKcs o su inhibición química con NU7026 aumentan la genotoxicidad de los venenos de topolI en células de mamíferos. Este efecto se asoció con una importante citotoxicidad reflejada en la disminución del IM.

El rol de D-NHEJ en impedir la progresión de las RDC inducidas por venenos de topolI se determinó analizando la presencia de MN en la fase G1 posterior al tratamiento.

Los MN se originan por fragmentos cromosómicos acéntricos o por cromosomas enteros que no son incorporados en el núcleo de la célula hija durante la división celular.

Las líneas celulares CHO9 y XR-C1 muestran un aumento ($p < 0,0001$, test t de Student) de células micronucleadas en los cultivos asincrónicos y en los sincronizados en G2 y tratados con IDA y ETO en relación a los cultivos controles no tratados (Figura 3).

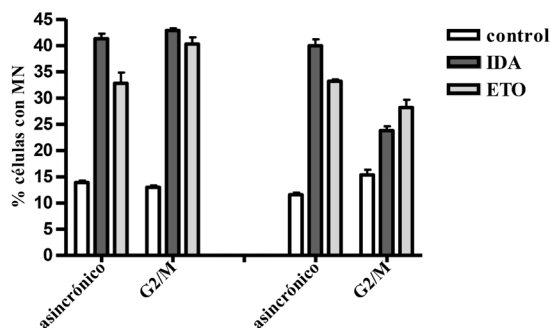


Figura 3. Porcentajes de células CHO9 y XR-C1 con micronúcleos (MN) inducidos por IDA o ETO en cultivos asincrónicos o sincronizados en la fase G2.

Cuando las células XR-C1 se trataron en la fase G2/M, la frecuencia de MN inducida por IDA y ETO fue menor en relación a las restantes frecuencias obtenidas. Para evaluar la posible causa de esta disminución se analizó el efecto de estos agentes sobre la progresión del ciclo celular por citometría de flujo y la muerte celular empleando la coloración naranja de acridina-bromuro de etidio. Las células acumuladas en G2 se trataron con IDA o ETO y se liberaron por 8-10hs en medio completo (Figura 4).

El porcentaje de muerte celular (células apoptóticas y necróticas) aumentó y la distribución de la población celular se acumuló en la fase G2 en los cultivos tratados en relación a los controles. Tanto la muerte celular como la activación del punto de control G2/M imposibilitaron a las células XR-C1 alcanzar la fase G1 posmitótica donde se manifestarían los MN inducidos por los tratamientos con IDA o ETO. Esto sugiere que D-NHEJ permite la progresión de alteraciones cromosómicas en células tratadas con los venenos de topoisomerasa en G2.

Para corroborar este efecto se evaluaron las RDC (focos γ H2AX) persistentes en los MN y en los núcleos principales de células HeLa binucleadas (BN) en presencia del inhibidor NU7026 y de ETO 2 μ g/ml (Figura 5). La inhibición química de DNA-PKcs junto a ETO incrementó el porcentaje de células BN con MN, de MN con focos γ H2AX (A) y de células BN con focos γ H2AX en los núcleos principales (B) cuando se los compara con los valores obtenidos en el tratamiento con ETO. Además, el daño inducido por el tratamiento NU7026-ETO provocó una reducción importante en el porcentaje de células

BN si se lo compara con las células tratadas sólo con NU7026 (C), en cambio, el tratamiento con ETO indujo una ligera disminución en este porcentaje en relación al control expuesto a DMSO.

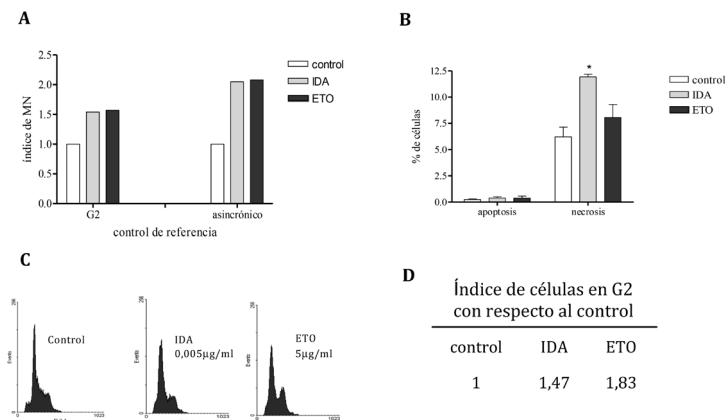


Figura 4. (A) MN inducidos por IDA o ETO en células XR-C1 tratadas en la fase G2 y en un cultivo asincrónico en relación al control=1. (B) Porcentaje de células apoptóticas y necróticas, * $p=0,0272$ test t de Student. (C) Histogramas del ciclo celular analizado por citometría de flujo, (D) Acumulación de células XR-C1 en G2 con respecto al control=1.

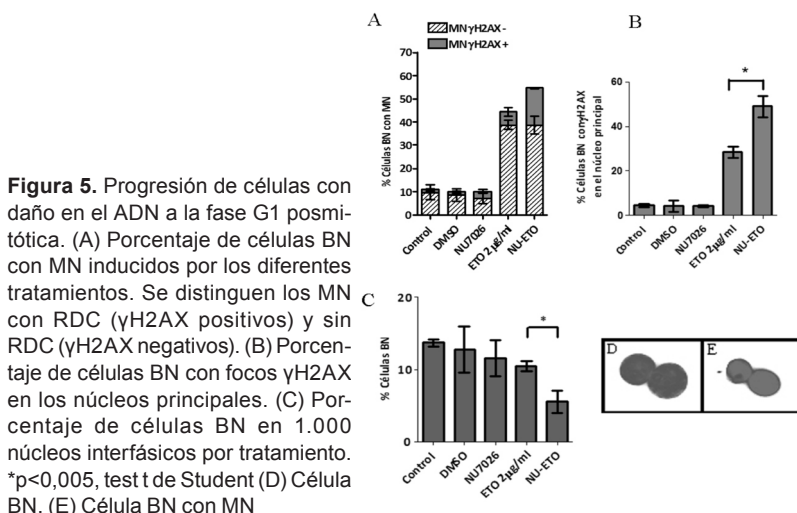


Figura 5. Progresión de células con daño en el ADN a la fase G1 posmitótica. (A) Porcentaje de células BN con MN inducidos por los diferentes tratamientos. Se distinguen los MN con RDC (γ H2AX positivos) y sin RDC (γ H2AX negativos). (B) Porcentaje de células BN con focos γ H2AX en los núcleos principales. (C) Porcentaje de células BN en 1.000 núcleos interfásicos por tratamiento. * $p<0,005$, test t de Student (D) Célula BN. (E) Célula BN con MN

CONCLUSIÓN

La actividad de la vía D-NHEJ está involucrada en la reparación de la mayoría de las RDC inducidas por los venenos de topolII IDA o ETO en células de hámster y humanas, por lo tanto, la presencia de DNA-PKcs es fundamental para evitar la permanencia de estas lesiones. La deficiencia de DNA-PKcs en las células XR-C1 o su inhibición química con NU7026 llevaron a que las RDC fueran reparadas por la vía B-NHEJ generando un aumento de aberraciones de tipo cromatídico. Junto a esta genotoxicidad, se produjo un incremento en la citotoxicidad.

Aunque ambas vías son potencialmente mutagénicas, es D-NHEJ la que intenta mantener la integridad cromosómica y a su vez, promover la progresión de células con daño en el ADN al siguiente ciclo celular.

SUMMARY

DNA topoisomerase II (topolII) poisons, idarubicin (IDA) and etoposide (ETO), stabilize DNA-topolII complexes preventing the relegation of broken ends and leading to the generation of permanent DNA-DSB. These lesions affect the genome stability producing tumorigenesis or cell death. Mammalian cells use nonhomologous end joining (NHEJ) repair pathway to protect the genome from the deleterious effects of DNA-DSB. DNA-PKcs is involved in NHEJ and this pathway was termed D-NHEJ. When DNA-PKcs becomes compromised, cells employ an alternative form of NHEJ which operates as a backup, B-NHEJ. The present study evaluated the contribution of D-NHEJ in the repair of IDA- or ETO-induced damage in mammalian cells treated in G2 phase. DNA-DSB was assessed by the histone H2AX phosphorylation (γ H2AX) on Chinese hamster cell lines. XR-C1, DNA-PKcs deficient cells, showed a persistent DNA damage in comparison with the proficient cell line CHO9. DNA-DSB are the ultimate lesions that may be converted into chromosome aberrations by unrepair and/or misrepair. An increase of chromatid breaks and exchanges was observed in the first mitosis of CHO9 following topolII poison-treatments. Similar results were obtained in the human cell line HeLa. The deficiency or chemical inhibition of DNA-PKcs produced a more prominent increment in chromatid-type aberrations demonstrating the participation of B-NHEJ in DNA-DSB repair. Furthermore, after IDA or ETO exposure in G2, micronuclei (MN) analysis in G1 postmitotic cells allowed the eval-

uation of aberrant cells progression. Both topolI poisons induced an important increase in MN in CHO9 and HeLa cells whereas XR-C1 cells exhibited a MN decrease. This reduction was due to a cell accumulation at G2/M and death. Inhibition of DNA-PKcs activity with NU7026 potentiated the MN induction in HeLa cells. In conclusion, D-NHEJ pathway contributes to maintain chromosome integrity and to promote the progression of chromosome damaged cells to the following cell cycle.

REFERENCIAS

1. Deweese JE, Osheroff N. The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing. Review. *Nucleic Acids Res* 37: 738-748, 2009.
2. Durante M, Bedford JS, Chen DJ, Conrad S, Cornforth MN, Natarajan AT, van Gent DC, Obe G. From DNA damage to chromosome aberrations: joining the break. *Mutat Res* 756: 5-13, 2013.
3. Iliakis G. Backup pathways of NHEJ in cells of higher eukaryotes: cell cycle dependence. Review. *Radiother Oncol* 92: 310-315, 2009.
4. Jeggo PA, Geuting V, Löbrich M. The role of homologous recombination in radiation-induced double-strand break repair. Review. *Radiother Oncol* 101:7-12, 2011.
5. Leone G, Fianchi L, Pagano L, Voso MT. Incidence and susceptibility to therapy-related myeloid neoplasms. *Chem Biol Interact* 184: 39-45, 2010.
6. Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. Review. *Annu Rev Biochem* 79:181-211, 2010.
7. McClendon AK, Osheroff N. DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. Review. *Mutat Res* 623: 83-97, 2007.
8. Nitiss JL. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. Review. *Nat Rev Cancer* 9: 338-350, 2009.

ROL DE LA VIA DE SEÑALIZACIÓN NOTCH EN CÉLULAS OVÁRICAS TUMORALES”

Dra. Griselda Irusta

Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET.

A pesar de la investigación que se ha llevado adelante estas últimas tres décadas, el cáncer de ovario epitelial (EOC) es una de las enfermedades ginecológicas que presenta mayor mortalidad y es la enfermedad ginecológica más difícil de diagnosticar, detectar y tratar. El carcinoma epitelial de ovario es una de las neoplasias ginecológicas malignas más comunes y la quinta causa más frecuente de muerte en mujeres [1]. Además, las células tumorales poseen gran capacidad de diseminarse a la cavidad peritoneal generando ascitis. Esta alta capacidad metastásica es una de las principales causas de los fracasos de los tratamientos [2]. Dadas las limitaciones para la detección temprana de este tipo de tumor, los pacientes dependen del éxito del tratamiento. Debido a estas causas, se están llevando a cabo numerosos estudios y ensayos clínicos para refinar el tratamiento actual y probar el valor de diferentes abordajes de terapia posoperatoria con fármacos y radioterapia.

El proceso de transición epitelio-mesenquimal (EMT) es el único proceso mediante el cual las células epiteliales sufren cambios morfológicos característicos de una transición de fenotipo epitelial a fibroblástico, llevando a un aumento en la movilidad e invasión de las células[3]. Este proceso posee un rol fundamental en la progresión tumoral e involucra la pérdida de uniones célula-célula, reorganización del citoesqueleto de actina y estimulación de marcadores mesenquimales como fibronectina, α -actina de músculo liso, vimentina y N-caderina[4]. Una disminución en las uniones intercelulares, incluyendo disminución y re-localización de la proteína E-caderina y β -caderina de la membrana al núcleo también llevan a la TEM. Entre los factores inductores de la TEM, se encuentra el TGF β -1 el cual se localiza tanto en células tumorales ováricas como en células estromales y raramente se encuentra en el epitelio de ovario normal[5].

El sistema Notch determina la proliferación, diferenciación y apoptosis de varios tipos celulares en mamíferos [6,7,8]. Puntualmente, en cáncer de

ovario se ha observado una mayor expresión de algunos de los miembros de este sistema comparado a epitelio de ovario normal [9,10]. Además, en distintas líneas celulares de ovario, Notch1 confiere ventajas proliferativas y de supervivencia celular, sugiriendo un rol importante por parte de este sistema en esta patología [11]. En nuestro laboratorio hemos demostrado su acción proliferativa en células de granulosa tumoral humana y la existencia de una expresión diferencial de algunos miembros de Notch en células tumorales y normales evidenciando una función importante de este sistema en esta patología [12]. Este sistema está formado por cuatro receptores (Notch1-4) y cinco ligandos (Jagged1, -2; Delta-like 1 (DLL1), DLL3 y DLL4), todas proteínas de membrana. Al interactuar, los receptores sufren una serie de clivajes que culminan en la liberación del dominio intracelular del receptor el cual transloca al núcleo donde actúa sobre genes blanco. Los ratones deficientes en alguno de estos componentes mueren durante la embriogénesis con defectos en el remodelamiento vascular [13,6]. Se ha observado que el sistema Notch interactúa con factores como Snail, Slug y TGF β -1 y promueve la EMT [14]. Sahlgren y col. (2008) demostraron en diferentes líneas celulares incluyendo SKOV3 que Notch regula Snail1 y que la inhibición de este sistema bloquea la EMT inducida por hipoxia [15]. *Sin embargo, al momento no se ha estudiado el rol de Notch en la TEM inducida por TGF β -1, principal inductor de la transición epitelio mesenquimal, en células tumorales ováricas.*

El objetivo de este proyecto es estudiar el rol del camino de señalización Notch durante la transición epitelio-mesenquimal (EMT) en una línea celular tumoral de ovario de origen epitelial (SKOV3).

Para llevar a cabo nuestro objetivo, se estudiaron características asociadas a la EMT en células SKOV3 a las cuales se les indujo la EMT mediante la incubación con el Factor Transformante Beta 1 (TGF β -1)

Análisis de cambios morfológicos en células SKOV3

Se evaluó el efecto de la inhibición del sistema Notch mediante la utilización del inhibidor DAPT, en el proceso de EMT en la línea celular SKOV3 establecida a partir de un carcinoma ovárico epitelial humano. Las células SKOV3 fueron incubadas en las siguientes condiciones durante 72 hs:

- a. Control (ausencia de estímulos),

b. TGF- β (10 ng/ml, 72 hs) para inducir la EMT

c. DAPT (10 μ M, 72 hs), **d.** TGF- β +DAPT.

En las células incubadas en condiciones controles, se observó una morfología poligonal típicamente epitelial y las células se encontraban en contacto unas con otras, característico de un tejido epitelial (fig 1).

En presencia de TGF β -1, las células adquirieron una morfología típica fibroblástica, alargada, y las células pierden el contacto entre ellas. En presencia de DAPT no se observaron cambios respecto del control, pero fue muy interesante observar que la co-incubación con TGF- β previno el cambio morfológico inducido por este factor y característico de la transición (fig 1).

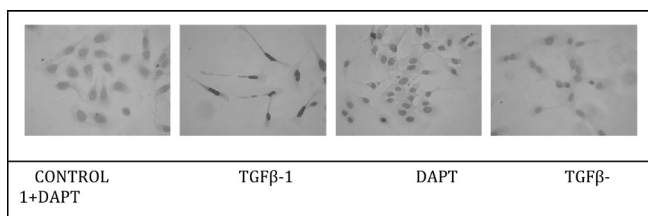


Figura 1: Morfología de células SKOV3 incubadas en diferentes condiciones. Aumento 40X.

También se analizó la polimerización de la actina del citoesqueleto utilizando la técnica de Falodina. La Faloidina es una toxina que se une a la actina F, impidiendo su despolimerización. La Faloidina se une específicamente en la interfase entre las subunidades de F-actina, y en particular la utilizada en este ensayo se encuentra acoplada al fluorescente TRITC. La incubación con TGF- β 1 disminuyó la actina dispuesta marginalmente como se observaba en las células controles, e indujo la formación de gruesas fibras centrales que demuestran una activa polimerización de la actina y que además se encuentran atravesando las células. La incubación con DAPT no indujo cambio alguno en la disposición del citoesqueleto y nuevamente, la co-incubación con TGF- β 1 mostró un arreglo en la organización de la actina similar al observado en las células control (fig 2).

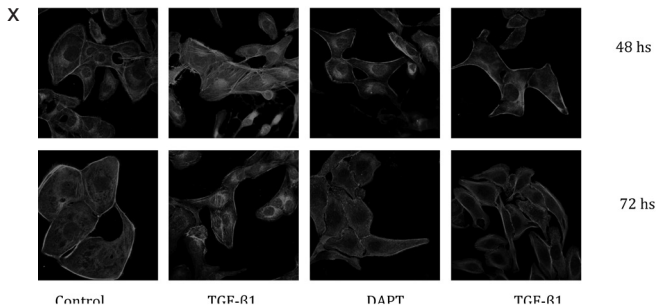


Figura 2: Ensayo de Faloidina en células SKOV3 incubadas en las diferentes condiciones citadas, a 48 hs y 72 hs de cultivo. Aumento 60X, microscopía confocal.

Expresión de las proteínas E y N-caderina y localización celular de β -catenin

Durante el proceso de TEM, se ha descrito el “switch” de caderinas, que implica la pérdida de E-caderina seguido de un aumento de N-caderina [16]. Nosotros observamos que la incubación de las células SKOV3 con TGF- β 1 disminuyó la expresión de E-caderina y aumentó la expresión de N-caderina (fig 3). DAPT no produjo cambios en la expresión de las caderinas respecto de las condiciones control, pero la co-incubación con TGF- β 1 impidió el switch en la expresión de las caderinas característico del EMT (fig 3).

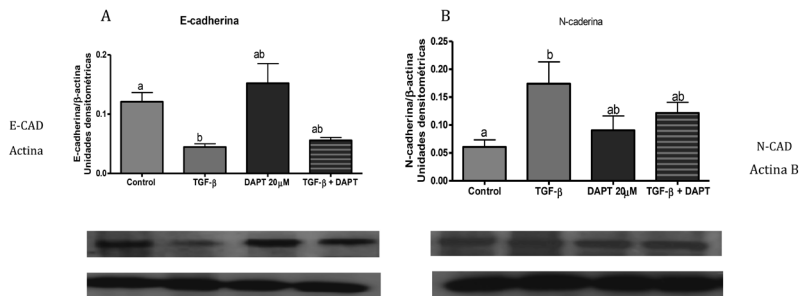


Figura 3: Expresión proteica de la proteína epitelial: E-caderina y mesenquimal: N-caderina en células SKOV3 en las diferentes condiciones de cultivo determinadas por la técnica de western blot. Diferentes letras indican diferencias significativas $p < 0,05$.

Estos resultados fueron observados también mediante la técnica de inmunocitoquímica de las células como puede observarse en las diferentes intensidades de ambas caderinas (fig 4).

La proteína de β -catenina se encuentra en el citoplasma, de forma soluble, y se encuentra regulada por el sistema Wnt/ β -catenina; y en la membrana celular se encuentra interaccionando con cadherinas. En el proceso de EMT, al disminuir los marcadores epiteliales, la β -catenina se transloca al núcleo regulando varios genes asociados a este proceso [17] En el presente trabajo analizamos mediante inmunofluorescencia la localización subcelular de la fosfo- β -catenina en Ser debido a que esta fosforilación aumentan la estabilidad y la actividad transcripcional de la misma [18]. En células controles, la fosfo- β -catenina se encontró principalmente en la membrana celular en sitios de contacto entre células (fig 5). En células en presencia de TGF- β , también se observó marca citoplasmática y disminución de marca en membrana denotando una activa translocación de la fosfo- β -catenina al núcleo. En las células tratadas con DAPT, claramente la localización es similar a la observada en células control, y nuevamente la co-incubación con TGF- β impidió la translocación al núcleo (fig 5).

Migración celular de células ováricas

Para dilucidar si la inhibición del sistema Notch afecta la capacidad de migrar de las células tumorales, realizamos ensayos de herida y transwell utilizando la línea celular SKOV3 incubada en las condiciones ya descritas. Las células incubadas en presencia de TGF- β aumentaron la capacidad de migrar en un 140% respecto de las células control. La presencia de DAPT no modificó la migración significativamente respecto del control, y la co-incubación con TGF- β bloqueó el aumento de migración inducido por este último (Control: 100 ± 17.4 vs TGF- β : 239.5 ± 42.9 , $p < 0.05$; DAPT: 61.07 ± 16.4 ; TGF- β +DAPT: 48.6 ± 23.7 , expresado en porcentaje de migración) (fig 6).

Estos resultados fueron similares a lo observado por el ensayo de migración por transwell, donde nuevamente TGF- β estimuló la migración celular, siendo estadísticamente no significativo las diferencias entre los otros tratamientos (fig 7).

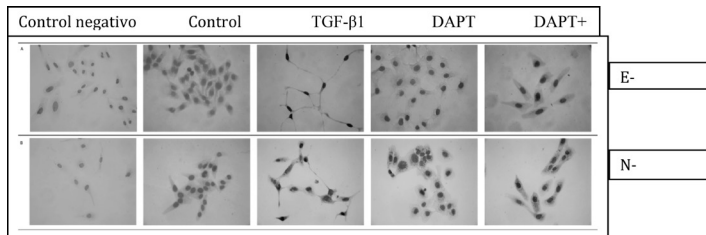


Figura 4: Inmunocitoquímica de la proteína E-caderina y N-caderina en células SKOV3 en las diferentes condiciones de cultivo.

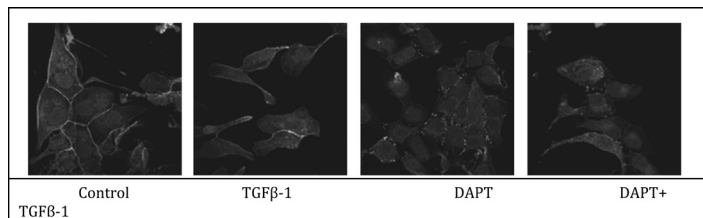


Figura 5: Localización subcelular de la proteína fosfo- β -catenina (verde: FITC), en células SKOV3 en presencia de faloidina (rojo) para denotar el citoesqueleto. Aumento 60X.

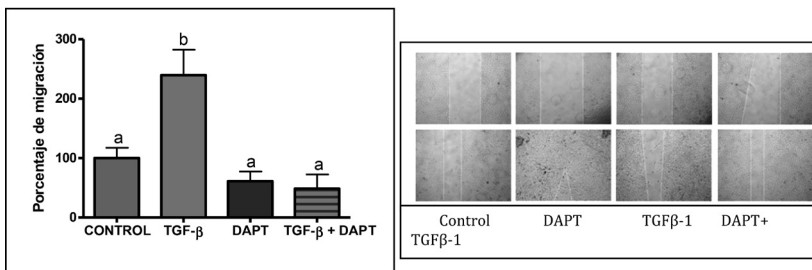


Figura 6: Migración de células SKOV3 en las diferentes condiciones de cultivo. Se fotografió a tiempo 0hs: momento en el cual se realiza la herida y luego a tiempo 8 hs: momento donde se realiza la segunda fotografía. Se calculó el área libre de células y con ello se obtuvo el porcentaje de migración graficado. Diferentes letras indican diferencias significativas $p < 0,05$.

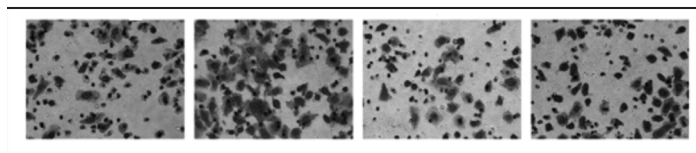
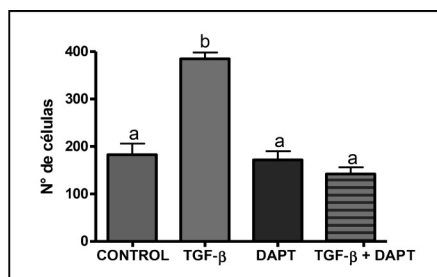


Figura 7: Ensayo de migración por transwell de las células SKOV3 incubadas en las diferentes condiciones. Las células se sembraron sobre insertos que contienen filtros de 0,2 μm , luego se les agregó el estímulo y pasado determinado tiempo se contaron el número de células que atravesaron el filtro. Las mismas fueron teñidas con hematoxilina para poseer ser contadas con facilidad y se determinó el número de células que migró como lo indica el gráfico. Diferentes letras indican diferencias significativas $p < 0,05$.

DISCUSIÓN:

En este trabajo hemos demostrado que el sistema Notch participa en el proceso de Transición Epitelio-Mesenquimal (EMT) de células ováricas tumorales humanas (línea celular SKOV3), inducido por TGF β -1, uno de los principales inductores de este cambio de fenotipo celular imprescindible para el proceso de metástasis en cáncer. Con los ensayos *in vitro* que se realizaron observamos que, como se esperaba, cuando las células se incubaron en presencia del principal factor inductor de EMT, TGF β -1, se observaron cambios característicos de la EMT como ser cambio en la morfología celular, en la disposición del citoesqueleto y en expresión y localización celular de proteínas que marcan el cambio fenotípico de epitelial a mesenquimal (disminución de E-caderina, aumento de N-caderina y Translocación nuclear de fosfo- β -catenina). Además, las células SKOV3 aumentaron su capacidad de

migrar en presencia de TGF β -1, acción que en un tumor favorece su capacidad de migración e invasión. Demostramos, en principio, que efectivamente TGF β -1 induce cambios fenotípicos en las células SKOV3 que coinciden con lo que ocurre durante la EMT. Sin embargo, cuando inhibimos el sistema Notch mediante la incubación de las células SKOV3 con DAPT, observamos que estas conservan su fenotipo epitelial y por lo tanto no detectamos cambios en el fenotipo celular. Interesantemente, al inducir el proceso en presencia de TGF β -1 y de forma simultánea inhibir al sistema Notch, observamos un impedimento de parte de las células en entrar en el proceso de EMT. Esta co-incubación, bloqueó el cambio morfológico, el cambio en el citoesqueleto, el “switch” de las proteínas caderinas y la Translocación de fosfo- β -catenina. Asimismo, impidió el aumento de la capacidad migratoria de las células que se inducía en presencia de TGF β -1. Por lo tanto, concluimos que la inhibición del sistema Notch podría ser una potencial estrategia terapéutica a estudiar en mayor profundidad para impedir la diseminación tumoral en cáncer de ovario tumoral.

ABSTRACT

Ovarian cancer –the most lethal of all gynecologic malignancies– is the eighth most common cancer overall, and the fifth leading cause of death among women. The high mortality of ovarian cancer is due mainly to the wide dissemination of peritoneal implants of carcinoma cells throughout the abdomino-pelvic cavity. The aim of this study was to evaluate the involvement of Notch signaling in Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT)-induced by TGF β -1, in an ovarian tumor cell line, SKOV3. For this purpose we used the Notch system inhibitor, DAPT and we incubated the cells in the presence of TGF β -1; DAPT; TGF β -1+DAPT or in the absence of stimulus (control). We observed that TGF β -1 induced changes associated to EMT process: morphological changes, cytoskeleton rearrangement, downregulation of epithelial marker (E-cadherin) and increment in mesenchymal marker (N-cadherin), nucleous translocation of phospho- β -catenin Ser and increment cellular migration. Neither of these changes were observed in the presence of DAPT alone compared to control cells, but interesting, the co-incubation with DAPT and TGF β -1, abolished all these features analyzed associated to Epithelial to Mesenchymal Transition. We conclude in this work, that Notch system is involved at least in part, in the Epithelial to Mesenchymal Transition-induced

by TGF β -1, one of the main inducers of this process, in an ovarian carcinoma epithelial cell line. This is interesting, since these results suggest that Notch system could be considered as a potential target in ovarian cancer metastasis, one of the main cause of the high death in women with this type of tumours.

REFERENCIAS

1. R. Yancik, Ovarian cancer. Age contrasts in incidence, histology, disease stage at diagnosis, and mortality, *Cancer* 71 (1993) 517 - 523.
2. R. Hogg and M. Friedlander, Biology of epithelial ovarian cancer: implications for screening women at high genetic risk, *J.Clin.Oncol.* 22 (2004) 1315 - 1327.
3. H. Hugo, M. L. Ackland, T. Blick, M. G. Lawrence, J. A. Clements, E. D. Williams, and E. W. Thompson, Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression, *J.Cell Physiol* 213 (2007) 374 - 383.
4. Z. Wang, Y. Li, D. Kong, S. Banerjee, A. Ahmad, A. S. Azmi, S. Ali, J. L. Abbruzzese, G. E. Gallick, and F. H. Sarkar, Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway, *Cancer Res.* 69 (2009) 2400 - 2407.
5. C. Hesling, L. Fattet, G. Teyre, D. Jury, P. Gonzalo, J. Lopez, C. Vanbelle, A. P. Morel, G. Gillet, I. Mikaelian, and R. Rimokh, Antagonistic regulation of EMT by TIF1gamma and Smad4 in mammary epithelial cells, *EMBO Rep.* 12 (2011) 665 - 672.
6. T. Iso, Y. Hamamori, and L. Kedes, Notch signaling in vascular development, *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 23 (2003) 543 - 553.
7. E. C. Lai, Keeping a good pathway down: transcriptional repression of Notch pathway target genes by CSL proteins, *EMBO Rep.* 3 (2002) 840 - 845.
8. J. A. Harper, J. S. Yuan, J. B. Tan, I. Visan, and C. J. Guidos, Notch signaling in development and disease, *Clin.Genet.* 64 (2003) 461 - 472.
9. K. H. Lu, A. P. Patterson, L. Wang, R. T. Marquez, E. N. Atkinson, K. A. Baggerly, L. R. Ramoth, D. G. Rosen, J. Liu, I. Hellstrom, D. Smith, L. Hartmann, D. Fishman, A. Berchuck, R. Schmandt, R. Whitaker, D. M. Gershenson, G. B. Mills, and R. C. Bast, Jr., Selection of potential markers for epithelial ovarian cancer with gene expression arrays and recur-

- sive descent partition analysis, *Clin.Cancer Res.* 10 (2004) 3291 - 3300.
10. N. I. Euer, S. Kaul, H. Deissler, V. J. Mobus, R. Zeillinger, and U. H. Weidle, Identification of L1CAM, Jagged2 and Neuromedin U as ovarian cancer-associated antigens, *Oncol.Rep.* 13 (2005) 375 - 387.
 11. S. L. Rose, M. Kunnimalaiyaan, J. Drenzek, and N. Seiler, Notch 1 signaling is active in ovarian cancer, *Gynecol.Oncol.* (2010)
 12. G. Irusta, M. C. Pazos, D. Abramovich, Z. de, I, F. Parborell, and M. Tesone, Effects of an Inhibitor of the Gamma-Secretase Complex on Proliferation and Apoptotic Parameters in a FOXL2-Mutated Granulosa Tumor Cell Line (KGN), *Biol.Reprod.* (2013)
 13. J. L. Li and A. L. Harris, Notch signaling from tumor cells: a new mechanism of angiogenesis, *Cancer Cell* 8 (2005) 1 - 3.
 14. M. Nosedá, G. McLean, K. Niessen, L. Chang, I. Pollet, R. Montpetit, R. Shahidi, K. Dorovini-Zis, L. Li, B. Beckstead, R. E. Durand, P. A. Hoodless, and A. Karsan, Notch activation results in phenotypic and functional changes consistent with endothelial-to-mesenchymal transformation, *Circ.Res.* 94 (2004) 910 - 917.
 15. C. Sahlgren, M. V. Gustafsson, S. Jin, L. Poellinger, and U. Lendahl, Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105 (2008) 6392 - 6397.
 16. J. B. Kim, S. Islam, Y. J. Kim, R. S. Prudoff, K. M. Sass, M. J. Wheelock, and K. R. Johnson, N-Cadherin extracellular repeat 4 mediates epithelial to mesenchymal transition and increased motility, *J.Cell Biol* 151 (2000) 1193 - 1206.
 17. S. Yamada, S. Pokutta, F. Drees, W. I. Weis, and W. J. Nelson, Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex, *Cell* 123 (2005) 889 - 901.
 18. S. Taurin, N. Sandbo, Y. Qin, D. Browning, and N. O. Dulin, Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase, *J.Biol. Chem.* 281 (2006) 9971 - 9976.

CONTRIBUCIÓN DE NEUTRÓFILOS EN LA ELIMINACIÓN DE UNA INFECCIÓN BACTERIANA EN UN MODELO MURINO DE TOLERANCIA AL LPS

Verónica Inés Landoni

Instituto de Medicina Experimental (IMEX-CONICET)

Academia Nacional de Medicina

SÍNTESIS

La sepsis 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. La sepsis afecta al 40% de los individuos que ingresan a las unidades de cuidados intensivos (UCI), la sepsis severa ocurre en el 30% y el shock séptico (sepsis severa más hipotensión persistente) en el 15%. Asimismo, alrededor de un 30% de los pacientes con sepsis severa fallecerán. Este porcentaje se eleva a un 50-70% si se desarrolla shock séptico, siendo ésta la principal causa de mortalidad en las UCI. El sistema inmune de los pacientes con sepsis exhibe una respuesta bifásica. Inicialmente existen evidencias de una inflamación sistémica exagerada la cual se cree es causada por la estimulación de células inmunes (monocitos/macrófagos) por microbios y/o sus productos liberados al establecerse la sepsis. Durante la sepsis, la inflamación se ha considerado como el elemento esencial de la respuesta del huésped. El lipopolisacárido (LPS) es el componente principal de la membrana celular de los microorganismos Gram negativos y es una importante causa de la sepsis tanto en humanos como en animales. Más tarde esta fase parece dar lugar a lo que aparentemente es un estado general de supresión inmune, denominada a menudo, inmunoparálisis o inmunosupresión postinflamatoria. En este sentido, se vuelve sólida la hipótesis que atribuye al desarrollo de un estado de inmunosupresión post-infecciosa como factor relevante en el pronóstico de la sepsis. De hecho, la mayoría de los casos fatales se asocian a pacientes sépticos inmunosuprimidos.

La tolerancia a lipopolisacáridos (LPS) constituye una adaptación al stress, en la que que un contacto primario con LPS causa una respuesta mínima cuan-

do una segunda exposición con el mismo estímulo ocurre. Sin embargo, importantes mecanismos de la defensa activos son montados durante el estado de tolerancia. El objetivo de este proyecto fue determinar la contribución de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) en la eliminación de una infección bacteriana en un modelo murino de tolerancia a LPS. Para ello se empleó el modelo murino de tolerancia a LPS (animales TOL), con un esquema de inyecciones diarias de pequeñas dosis de LPS (4 dosis de 5 ug). La infección polibacteriana se realizó inoculando en la cavidad peritoneal bacterias obtenidas de intestinos de animales control (CTROL). La depleción de macrófagos peritoneales mediante el uso de clodronato en liposomas permite excluir la contribución de estas células posibilitando centrar este estudio exclusivamente en los PMN presentes en el sitio tras el desarrollo de la infección.

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. Esto no habilita a plantear un estudio pormenorizado estado funcional de los PMN en un contexto de inmunosupresión asociada a procesos sépticos. Así, el objetivo central de este proyecto fue analizar el estado funcional y el rol de los PMN de animales tolerantes en la resolución de una infección polibacteriana. Para ello se evaluaron *in vivo* los mecanismos involucrados y su relevancia en las distintas etapas en el proceso resolución de la infección en ratones tolerantes al LPS

Luego del establecimiento de la tolerancia, la eliminación de una infección polimicrobiana producida localmente fue más eficiente en ratones tolerantes tanto en la presencia o ausencia de los macrófagos locales. Al evaluar los motivos de esta aumentada eficiencia de eliminación de bacterias, observamos una relación con el hecho de que un mayor número de PMN migraron al sitio de infección como resultado de un aumento del número de PMN presentes en el pool marginal los cuales a su vez mostraron una mayor capacidad quimiotáctica. En este fenómeno no influyeron diferencias en la actividad fagocítica o en la producción de especies reactivas. Sin embargo que observamos que un mayor número de PMN migrados al sitio de infección en los ratones tolerantes produce *in vitro* una mayor cantidad de trampas extracelulares de DNA (NET). Teniendo en cuenta esto, determinamos la relevancia de la NETosis en la aumentada eficiencia de eliminación de bacterias observada en los ratones tolerantes. En este sentido la inoculación *in vivo* de una nucleasa para destruir las NET producidas por los neutrófilos se abolió el aumento de la eficiencia de eliminación de la infección bacteriana observada

en tolerantes. Esto determinó el rol fundamental que juega la netosis en la resolución de una infección en un contexto tolerante.

En resumen, un mayor número de PMN que llegan al sitio del desafío bacteriano, presumiblemente procedentes del pool marginal con una mayor respuesta quimiotáctica, junto con una capacidad de formación de NET aumentada en los PMN migrados, como se ha demostrado *in vitro*, parecen ser los principales mecanismos que conllevan a una prevención más eficiente de la propagación de bacterias en el estado de tolerancia.

Dado los resultados obtenidos, creemos que el LPS prima los mecanismos involucrados en el aumento de la eliminación de bacterias en ratones tolerantes puede ser desencadenada en un intento de compensar las deficiencias observadas en la respuesta inmune adaptativa registrada en estado de tolerancia.

SUMMARY

Tolerance to lipopolysaccharide (LPS) constitutes a stress adaptation, in which a primary contact with LPS results in a minimal response when a second exposure with the same stimulus occurs. However, active important defence mechanisms are mounted during the tolerant state. Our aim was to assess the contribution of polymorphonuclear neutrophils (PMN) in the clearance of bacterial infection in a mouse model of tolerance to LPS. After tolerance was developed, we investigated *in vivo* different mechanisms of bacterial clearance. The elimination of a locally induced polymicrobial challenge was more efficient in tolerant mice both in the presence or absence of local macrophages. This was related to a higher number of PMN migrating to the infectious site as a result of an increased number of PMN from the marginal pool with higher chemotactic capacity, not because of differences in their phagocytic activity or reactive species production. *In vivo*, neutrophils extracellular trap (NET) destruction by nuclease treatment abolished the observed increased clearance in tolerant but not in control mice. In line with this finding, *in vitro* NETs formation was higher in PMN from tolerant animals. These results indicate that the higher chemotactic response from an increased PMN marginal pool and the NETs enhanced forming capacity are the main mechanisms mediating bacterial clearance in tolerant mice. To sum up, far from being a lack of response, tolerance to LPS causes PMN priming effects which favour distant and local anti-infectious responses.

REFERENCIAS

1. Natanson, C., et al., *Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis*. Ann Intern Med, 1994. **120**(9): p. 771-83.
2. Vincent, J.L., et al., *Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study*. Crit Care Med, 2006. **34**(2): p. 344-53.
3. Vincent, J.L., F. Taccone, and X. Schmit, *Classification, incidence, and outcomes of sepsis and multiple organ failure*. Contrib Nephrol, 2007. **156**: p. 64-74.
4. Bernard, G.R., et al., *Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis*. N Engl J Med, 2001. **344**(10): p. 699-709.
5. Fisher, C.J., Jr., et al., *Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Phase III rhIL-1ra Sepsis Syndrome Study Group*. JAMA, 1994. **271**(23): p. 1836-43.
6. Abraham, E., et al., *Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group*. Lancet, 1998. **351**(9107): p. 929-33.
7. Perl, M., et al., *Contribution of anti-inflammatory/immune suppressive processes to the pathology of sepsis*. Front Biosci, 2006. **11**: p. 272-99.
8. Osuchowski, M.F., et al., *Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality*. J Immunol, 2006. **177**(3): p. 1967-74.
9. Adib-Conquy, M. and J.M. Cavaillon, *Compensatory anti-inflammatory response syndrome*. Thromb Haemost, 2009. **101**(1): p. 36-47.
10. Hotchkiss, R.S. and I.E. Karl, *The pathophysiology and treatment of sepsis*. N Engl J Med, 2003. **348**(2): p. 138-50.
11. Eichacker, P.Q., et al., *Risk and the efficacy of antiinflammatory agents: retrospective and confirmatory studies of sepsis*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **166**(9): p. 1197-205.
12. Bone, R.C., *Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS*. Crit Care Med, 1996. **24**(7): p. 1125-8.
13. Docke, W.D., et al., *Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment*. Nat Med, 1997. **3**(6): p. 678-81.
14. Muller Kobold, A.C., et al., *Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality*. Intensive Care Med, 2000. **26**(7): p. 883-92.

15. Efron, P. and L.L. Moldawer, *Sepsis and the dendritic cell*. Shock, 2003. **20**(5): p. 386-401.
16. Cavaillon, J.M., et al., *Endotoxin tolerance: is there a clinical relevance?* J Endotoxin Res, 2003. **9**(2): p. 101-7.
17. West, M.A. and W. Heagy, *Endotoxin tolerance: a review*. Crit Care Med, 2002. **30**(1 Suppl): p. S64-73.
18. Nduka, O.O. and J.E. Parrillo, *The pathophysiology of septic shock*. Crit Care Clin, 2009. **25**(4): p. 677-702, vii.
19. Peppercorn, A., J. Serody, and B. Cairns, *Reactivation of cytomegalovirus infection in critically ill immunocompetent patients*. JAMA, 2008. **300**(20): p. 2367-8; author reply 2368.
20. Landoni, V.I., et al., *Shiga toxin 1-induced inflammatory response in lipopolysaccharide-sensitized astrocytes is mediated by endogenous tumor necrosis factor alpha*. Infect Immun. **78**(3): p. 1193-201.

EL ROL DEL RECEPTOR ROR1 Y LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT EN EL DESARROLLO Y PROGRESIÓN DE MELANOMA.

Natalia Fernandez y Pablo Lopez Bergami_
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)

INTRODUCCIÓN

El melanoma es un cáncer que se origina a partir de los melanocitos de la piel normal, generalmente a partir de un lunar preexistente. Constituye la forma más severa de cáncer de piel y un importante problema sanitario. En los últimos años numerosas iniciativas a escala genómica, como el mapeo de aberraciones cromosómicas, la determinación de alteraciones en el número de copias (SCNA, *Somatic Copy Number Alterations*) y la detección de mutaciones en células tumorales han permitido identificar vías de señalización posiblemente involucradas en la génesis de melanoma. Recientemente, el entrecruzamiento de datos provenientes de dos estudios de este tipo realizados en células de melanoma reveló que las cuatro vías de señalización mas importantes la vía de señalización de Wnt, la señalización por caderinas, angiogénesis y melanogénesis [1,2].

La vía de señalización Wnt cumple un importante rol durante el desarrollo embrionario, controlando la proliferación, adhesión, destino, supervivencia, movimiento y polaridad celular [3]. Alteraciones en esta vía de señalización en la adultez están involucradas en una amplia variedad de patologías, incluyendo numerosos tipos de tumores. En humanos existen 19 ligandos Wnt, proteínas de secreción que actúan en forma autócrina o parácrina al interactuar con receptores Frizzled (Fdz), LRP, ROR y Ryk [4]. La interacción de los Wnts con los receptores lleva a la activación de la proteína Disheveled (Dvl) vía proteínas tipo G α , a partir de la cual la señalización se ramifica entre la denominada vía canónica y vías no canónicas. La vía canónica es la más estudiada y es fundamentalmente activada por Wnt1 y Wnt3a; involucra la translocación de β -catenina al núcleo, vía la inhibición de su complejo de degradación, y la activación del factor de transcripción TCF/LEF, el cual regula la expresión de diversos genes como c-myc y ciclina D1, entre otros. El término “vías no

canónicas” es utilizado en realidad para referirse a un numeroso conjunto de vías de señalización alternativas, tales como Wnt/PKC, Wnt/CAMKII, Wnt/Rho/ROCK, Wnt/proteína G β / γ /fosfodiesterasa/cGMP, Wnt/proteína G β / γ /fosfolipasa C y Wnt/JNK que se activan en respuesta a Wnt4, Wnt5a y Wnt11 entre otros [3, 5] (Fig. 2).

Las proteínas Wnt5a y ROR1

Entre los ligandos Wnt que activan la cascada no canónica el que más frecuentemente ha sido asociado a cáncer es Wnt5a, cuya expresión se encuentra aumentada en cáncer gástrico, de mama, colon, pulmón, ovario, páncreas, próstata y melanoma [3,5]. ROR1, al igual que ROR2, pertenece a la familia de receptores tirosina quinasa y también ha sido descrito como un receptor de Wnt5a [6]. Muy poco se sabe sobre las características y mecanismos de acción de estos receptores. Dentro del escaso conocimiento existente acerca de la función de ROR1 sobresale claramente su participación en mecanismos de sobrevivencia celular [7,8,9]. Recientemente, se demostró que ROR1 cumple un rol en el crecimiento tumoral y en la TEM en células de cáncer de mama [10, 11]. Hace sólo 3 meses se publicó el único trabajo sobre ROR1 en melanoma, en donde se demuestra su participación en la apoptosis celular [12].

RESULTADOS

Para comprender el origen de la activación constitutiva de la vía de Wnt no canónica en melanoma, determinamos la expresión de varios miembros de la vía (Fzd5 y Fzd7, Dkk3 y Wnt4 (resultados no mostrados) en líneas celulares generadas a partir de distintos estadios de melanoma empleando la técnica de PCR en tiempo real. También se determinó la expresión de los receptores ROR1 y ROR2 con relación al grado de malignidad celular. Mientras que el receptor ROR1 aumenta su expresión en células de estadios más avanzados, el receptor ROR2 la disminuye marcadamente (Fig. 1). Para estudiar la participación de ROR1 en la supervivencia celular de melanoma realizamos ensayos de proliferación mediante la técnica de MTT. En primer lugar, se observó una disminución de aproximadamente 30% en la proliferación celular de la línea celular A375 luego de silenciar la expresión de ROR1 mediante shRNA (Fig. 2). Resultados similares se obtuvieron para la línea Lu1205 (resultados no mostrados). Luego, analizamos si cambios en ROR1

alteran la expresión de Akt, una de las principales proteínas involucradas en la supervivencia celular. Encontramos que la expresión de Akt1 se encuentra disminuida al silenciar ROR1 y aumenta al sobreexpresar el ADNc de ROR1 (Fig. 3). Este resultado podría ser en parte responsable de la disminución de la proliferación de la línea celular A375 que expresa el shROR1.

Luego, analizamos si ROR1 participa en la apoptosis celular en melanoma . mediante la cuantificación de células luego de la tinción con Anexina V e Ioduro de Propidio (IP) en un citómetro de flujo. Se observó un aumento en los niveles de apoptosis inducida por privación de suero durante 48hs en ausencia de ROR1 (Fig. 4). Resultados similares se obtuvieron para la línea células Lu1205 (resultados no mostrados). A nivel molecular, observamos que las células que expresan el shROR1 presentan menores niveles de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y un aumento en los niveles de la proteína pro-apoptótica Bax (Fig. 5). En este mismo sentido, las células que expresan en ADNc de ROR1 poseen mayores niveles de Bcl-2 (Fig. 5). Estos cambios podrían cumplir un rol en la susceptibilidad a la apoptosis observada anteriormente.

ROR1 y Wnt5a en células de melanoma.

Dado que ROR1 es uno de los receptores descritos para el ligando Wnt5a y recordando la correlación positiva existente en la líneas celulares de melanoma entre la expresión de ambos (Fig. 1), nos preguntamos si la expresión de Wnt5a se encuentra afectada cuando ROR1 disminuye o aumenta. Encontramos que la inhibición de ROR1 reduce los niveles de Wnt5a en estas células. En este mismo sentido, la expresión del ADNc de ROR1 en las células A375 produjo un aumento de 3 veces en la expresión de Wnt5a (Fig. 6). Por otro lado, quisimos determinar si existía una regulación entre Wnt5a y ROR1, es decir, si Wnt5a afecta la expresión de ROR1. El tratamiento con Wnt5a produjo un aumento en los niveles del receptor ROR1 (Fig. 7), demostrando la existencia de una retroalimentación positiva entre ambos genes.

Expresión de caderinas y vimentina en células de melanoma.

Para poder interpretar las diferencias observadas en los niveles de expresión de ROR1 y Wnt5a (Fig. 1), analizamos los niveles de expresión de algunas de las moléculas de adhesión involucradas en la TEM, en particular el “switch de caderinas”. Se observó que la expresión de los marcadores mesenquimales (N-CAD y vimentina) se ve asociada a un mayor grado de malignidad celular (Fig. 8); mientras que lo inverso ocurre con la expresión de E-CAD. Si recordamos el perfil de expresión de ROR1, ROR2 y Wnt5a en

estas células (Fig. 1) podemos correlacionar la expresión de ROR1 y Wnt5a con un perfil celular tipo mesenquimal y agresivo.

Relación entre la expresión de ROR1 y los marcadores de la TEM

Los resultados descriptos sugieren una posible relación entre la expresión de ROR1 y los marcadores de la TEM. Por lo tanto, nos propusimos investigar si la pérdida o ganancia de expresión de ROR1 tiene un impacto sobre la expresión de las moléculas de adhesión características del tipo mesenquimal como N-CAD y vimentina. Se observó una disminución en los niveles de N-CAD y vimentina cuando los niveles de ROR1 se encuentran disminuidos (Fig. 9) y un aumento de las mismas con la sobreexpresión de ROR1 (Fig. 10). De esta manera, se confirma la existencia de una asociación entre los elevados niveles de expresión de ROR1 presentes en las células de melanoma más agresivas y el fenotipo mesenquimal.

Participación de ROR1 en la adhesión celular

De los resultados obtenidos se desprende la posible participación de ROR1 en procesos relacionados con la adhesión, motilidad e invasión celular. Es importante recordar que el aumento o disminución en los niveles de ROR1 afecta en el mismo sentido la expresión de Wnt5a, un ligando que ha sido asociado a cambios en la motilidad e invasión celular. Como una primera aproximación, realizamos ensayos de adhesión en las células A375 Scramble y shROR1. Se levantaron las células con una solución 0.05% tripsina – 0.5 mM EDTA o sólo con EDTA 20mM, se plaquearon la misma cantidad de células en placas de 96 pocillos y se las incubó 30 minutos o 6 horas a 37°C. Luego se fijaron y tiñeron las células con cristal violeta y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 560nm. Cuando las células fueron tratadas con tripsina no se observaron cambios en la adhesión celular, posiblemente porque las moléculas de adhesión responsables de la misma fueron escindidas de la superficie celular (Fig. 11). Sin embargo, cuando se trataron las células con una solución de EDTA en ausencia de tripsina, se obtuvo un aumento significativo en la adhesión celular a los 30 minutos en las células que poseen disminuida la expresión de ROR1 (Fig. 11).

El aumento en la adhesión celular a sustrato usualmente correlaciona de manera inversa con la motilidad celular [13], con lo cual estos resultados sugerirían que el aumento de la expresión de ROR1 en melanoma podría estar asociada a un fenotipo de mayor motilidad celular.

ROR1 afecta el crecimiento independiente de anclaje.

Una de las características distintivas de las células tumorales es la capacidad de crecer en ausencia de anclaje. ROR1 ha sido asociado con el remodelado de la expresión de marcadores de membrana de la TEM, cruciales en las interacciones celulares con la matriz extracelular necesarias para el crecimiento celular [14]. Investigamos entonces si la inhibición de ROR1 afectaba el crecimiento celular independiente de anclaje mediante ensayos de crecimiento celular en agar blando (*“soft agar”*). Se sembraron la misma cantidad de células A375 Scramble y shROR1 en un medio con 0.35% de agarosa sobre una superficie de 0.5% de agar, ambas capas con 10% de SFB. Luego de 3 semanas se observó que el número total de colonias formadas en la línea A375 Scramble fue mayor que en las shROR1 (203 ± 45 vs 93 ± 21) (Fig. 12A). A su vez, se analizó la distribución del tamaño de las colonias obtenidas en ambas condiciones y se observó una marcada disminución en el porcentaje de colonias de mayor tamaño en ausencia de ROR1 (Fig. 12B). Estos resultados sugieren que el aumento en los niveles de ROR1 en melanoma estaría involucrado en el mecanismo de crecimiento celular independiente de anclaje, ya que la inhibición de ROR1 reduce no sólo la cantidad de células capaces de generar colonias en agar blando sino también el tamaño de cada una de las colonias formadas.

CONCLUSIONES

En resumen, los resultados presentados muestran que el receptor de membrana ROR1 se expresa en las líneas celulares de melanoma más agresivas, al igual que su ligando Wnt5a. Demostramos que ROR1 cumple un importante rol en la fisiología celular, participando en la proliferación, apoptosis, adhesión y crecimiento en ausencia de sustrato. Más aún, demostramos que ROR1 participa en la regulación de la expresión de proteínas involucradas en estos procesos.

ABSTRACT

Melanoma represents a serious public health problem due to a sustained increase in its incidence and the lack of effective therapies for the metastatic stage. Clearly, a more profound understanding of its altered signaling pathways is required to develop more successful therapeutics. Activation of non-

canonical Wnt signaling in cancer has been described but poorly characterized. In melanoma, this pathway is constitutively active due to overexpression of Wnt5a. We have found that ROR1, a tyrosine kinase receptor of Wnt5a is overexpressed in melanoma cell lines. ROR1 silencing reduced cell proliferation and sensitized A375 cells to apoptosis in the absence of serum. We observed downregulation of Akt and Bcl2 upon ROR1 silencing. Higher expression levels of ROR1 in melanoma cell lines associated with expression of mesenchymal markers such as N-cadherin, vimentin and Wnt5a. Indeed, silencing of ROR1 decreased expression of such markers. Accordingly, ROR1 silencing induced an increase in cell adhesion and a reduction in anchorage-independent cell growth. These results suggest that ROR1 expression in melanoma contributes with melanoma progression.

REFERENCIAS

1. Stark, M. and N. Hayward, Cancer Res, 2007. **67**(6): p. 2632-42.
2. Valsesia, A., et al., PLoS One. **6**(4): p. e18369.
3. Rao, T.P. and M. Kuhl, Circ Res. **106**(12): p. 1798-806.
4. Miller, J.R., Genome Biol, 2002. **3**(1): p. REVIEWS3001.
5. Jessen, J.R., Zebrafish, 2009. **6**(1): p. 21-8.
6. Green, J.L., S.G. Kuntz, and P.W. Sternberg, Trends Cell Biol, 2008. **18**(11): p. 536-44.
7. Tyner, J.W., et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(21): p. 8695-700.
8. Choudhury, A., et al., Br J Haematol. **151**(4): p. 327-35.
9. MacKeigan, J.P., L.O. Murphy, and J. Blenis, Nat Cell Biol, 2005. **7**(6): p. 591-600.
10. Zhang, S., et al., PLoS One. **7**(3): p. e31127.
11. Cui, B., et al., Cancer Res. **73**(12): p. 3649-60.
12. Hojjat-Farsangi, M., et al., PLoS One. **8**(4): p. e61167.
13. Chen, H., et al., J Cell Sci, 1997. **110** (Pt 3): p. 345-56.
14. Guadamillas, M.C., A. Cerezo, and M.A. Del Pozo, J Cell Sci. **124**(Pt 19): p. 3189-97.

FIGURAS

Figura 1. PCR cuantitativa en tiempo real de los receptores ROR1 **A)** y ROR2 **B)** y del ligando Wnt5a **C)** en distintas líneas celulares de melanoma. Los resultados se expresan normalizados a los valores de expresión de RNP2 y relativizados a la línea Wm35 para ROR1 y SkMel28 para ROR2 y Wnt5a.

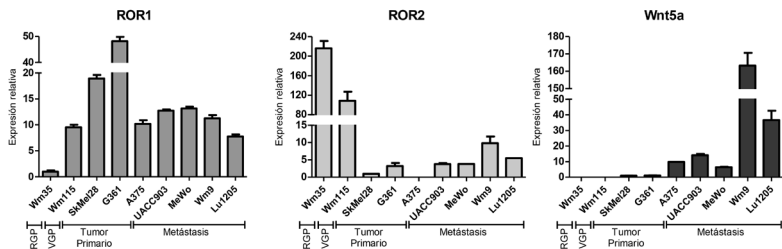


Figura 2. ROR1 contribuye a la proliferación celular. Ensayo de proliferación por MTT de células A375 estables para la expresión del shARN de ROR1B y Scramble. Se plaquearon la misma cantidad de células y se las cultivó en placas de 96 pocillos con 10% SFB durante 5 días. En paralelo se realizó una curva de calibración con un número de células conocido. El reactivo MTT se incubó durante 4 horas a 37°C, luego se disolvieron los cristales formados y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 560 nm. Los resultados se expresan como número de células luego de 5 días.

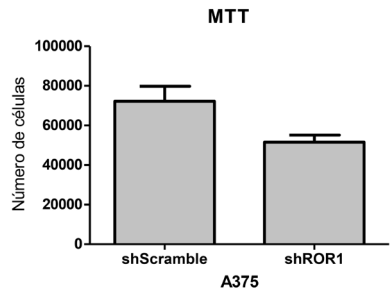


Figura 3. ROR1 regula los niveles de Akt1. **A)** PCR en tiempo real de Akt1 en células A375 estables para la expresión del shARN de ROR1B y Scramble. Los resultados se expresan normalizados a los niveles de RNP2 y relativizados a la línea Scramble. **B)** PCR en tiempo real de Akt1 en células A375 estables para la expresión del ADNc de ROR1 y vector vacío. Los resultados se expresan normalizados a los niveles de RNP2 y relativizados a la construcción vacía. **C)** Western blot de Akt1 en células A375 estables para la expresión del shARN de ROR1B y Scramble. Se empleó GAPDH como control de carga. N=3, $p<0,01$. **D)** Western blot de Akt1 en células A375 estables para la expresión del ADNc de ROR1 y el vector vacío. Se empleó GAPDH como control de carga.

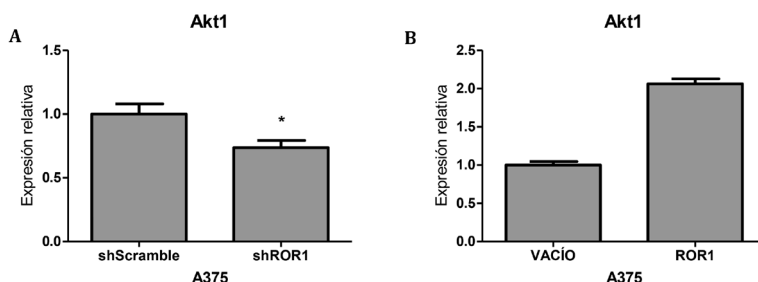


Figura 4. ROR1 se asocia a mecanismos de resistencia a apoptosis. Ensayo de apoptosis mediante la medición de Anexina V y IP en células A375 estables para la expresión del shARN de ROR1B y Scramble luego de 48 hs en cultivo en condiciones de 10 o 0% SFB. Los resultados se expresan como porcentaje de células marcadas con Anexina V e IP.

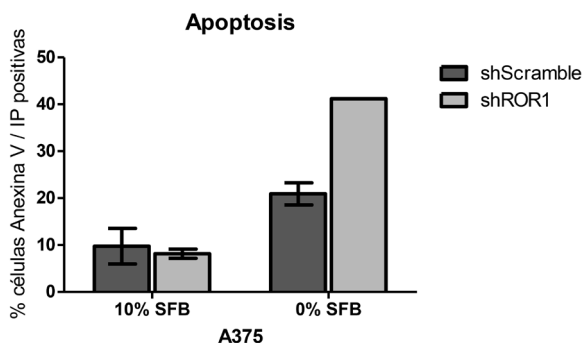


Figura 5. ROR1 afecta los niveles de Bcl-2. **A)** PCR en tiempo real de Bcl-2 en células A375 estables para la expresión del shARN de ROR1B y Scramble. Los resultados se expresan normalizados a los niveles de RNP2 y relativizados a la línea Scramble. **B)** Western blot de Bcl-2 y Bax en células A375 estables para la expresión del shARN de ROR1B y Scramble. Se empleó GAPDH como control de carga. **C)** PCR en tiempo real de Bcl-2 en células A375 estables para la expresión del ADNc de ROR1 y vector vacío. Los resultados se expresan normalizados a los niveles de RNP2 y relativizados a la construcción vacía.

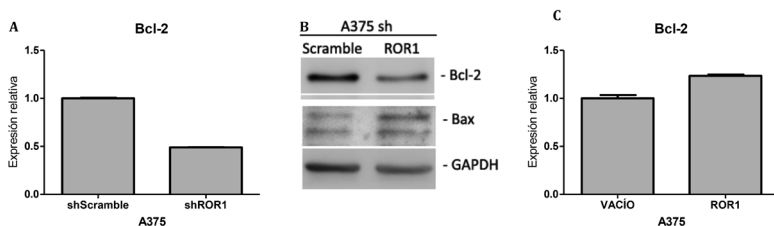
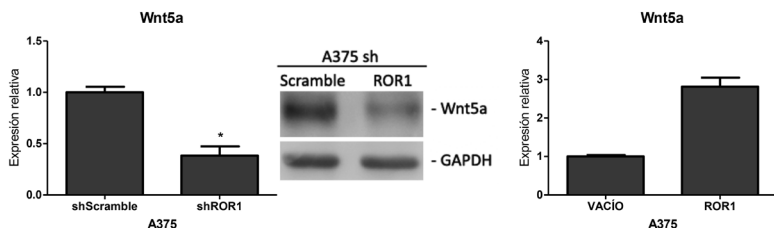


Figura 6. ROR1 regula la expresión de Wnt5a. **A)** PCR en tiempo real de células A375 estables para la expresión del shARN de ROR1 y Scramble. Los resultados se expresan normalizados a los niveles de RNP2 y relativizados a la línea Scramble. N=3, $p < 0.01$. **B)** Western blot de Wnt5a en A375 Scramble y shROR1. Se empleó GAPDH como control de carga. **C)** PCR en tiempo real de Wnt5a en células A375 estables para la expresión del ADNc de ROR1 y vector vacío. Los resultados se expresan normalizados a los niveles de RNP2.



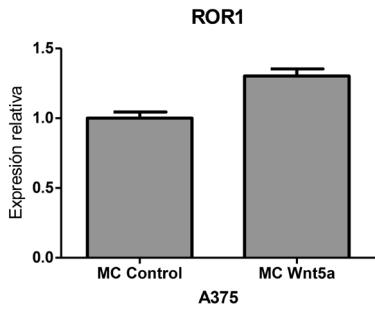


Figura 7. Wnt5a regula los niveles de ROR1. PCR en tiempo real de células A375 tratadas durante 10 horas con MC control o Wnt5a. Los resultados se expresan normalizados a los niveles de RNP2 y relativizados al tratamiento control.

Figura 8. PCR cuantitativa en tiempo real de N-CAD A), vimentina B) y E-CAD C) en distintas líneas celulares de melanoma. Los resultados se expresan normalizados a los valores de expresión de RNP2 y relativizados a la línea Wm35 para N-CAD y vimentina y a SkMel28 para E-CAD.

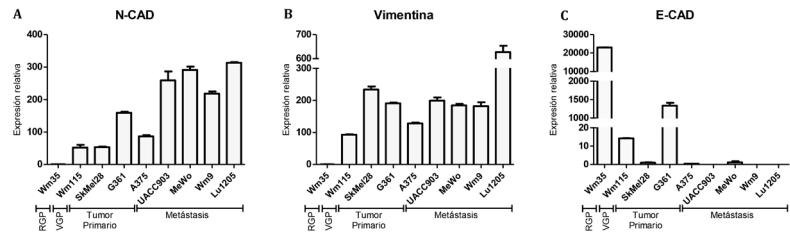


Figura 9. ROR1 regula la expresión de marcadores mesenquimales. **A)** PCR en tiempo real de N-CAD **A)** y vimentina **B)** en células A375 estables para la expresión del shARN de ROR1B y Scramble. Los resultados se expresan normalizados a los niveles de RNP2 y relativizados a la línea Scramble. N=3, $p<0,01$. **C)** Western blot de N-CAD en células A375 estables para la expresión del shARN de ROR1B y Scramble.

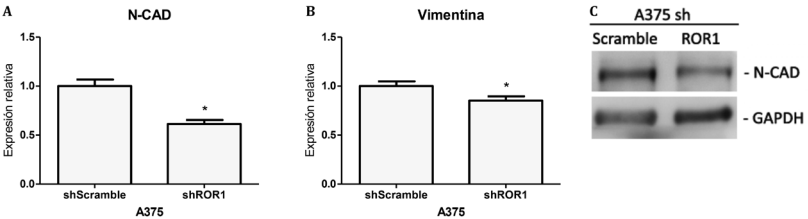


Figura 10. ROR1 regula la expresión de marcadores mesenquimales. **A)** PCR en tiempo real de N-CAD **A)** y vimentina **B)** en células A375 estables para la expresión del ADNc de ROR1 y vector vacío. Los resultados se expresan normalizados a los niveles de RNP2 y relativizados a la construcción vacía. **C)** Western blot de vimentina en células A375 estables para la expresión del ADNc de ROR1 y vector vacío.

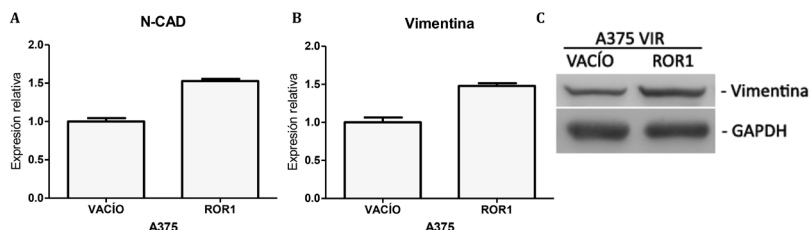


Figura 11. ROR1 disminuye la adhesión celular. Ensayo de adhesión celular en células A375 estables para la expresión del shARN de ROR1B y Scramble. Las células fueron levantadas con tripsina-EDTA o con EDTA 20mM, sembradas en igual cantidad en pacas de 96 pocillos e incubadas por 30 minutos a 37°C. Luego, se lavaron los pocillos con PBS, se fijaron las células con metanol y se tiñeron con cristal violeta. Los resultados se expresan como los valores de absorbancia (relativizados a la línea Scramble) medidos en cada línea sustrayendo el valor del blanco. N=3, p<0,05.

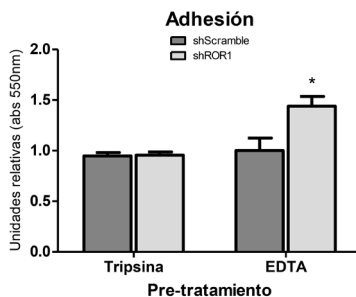
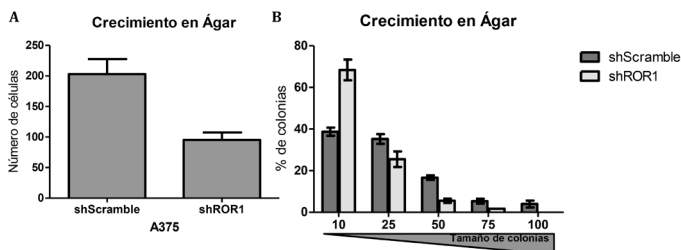


Figura 12. La inhibición de ROR1 disminuye el crecimiento independiente de anclaje. Ensayo de formación de colonias en ágar blando en células A375 estables para la expresión del shARN de ROR1 y Scramble. **A)** Número de colonias totales obtenidas. **B)** Distribución del tamaño de colonias obtenido, expresado como porcentaje de las colonias totales.



ROL DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS EN LA MALIGNIZACIÓN CELULAR Y LA PROGRESIÓN TUMORAL.

Paola Martínez Pulido, Manuel Oroño, Alejandro Español, María Ester
Castro, María Elena Sales y María Gabriela Lombardi

Laboratorio de Inmunofarmacología Tumoral, CEFYBO-CONICET-2- Cátedra de
Farmacología, facultad de Medicina, UBA.

INTRODUCCION

La transición hacia la malignidad de una célula está marcada por la alteración progresiva de una variedad de puntos de control genético e histopatológico, incluyendo la amplificación o inactivación de genes específicos, la expresión de marcadores tumorales, alteraciones estereotípicas en la célula y la arquitectura del tejido que culminan en la desregulación del ciclo celular, un crecimiento de tipo invasivo, incremento en la movilidad, quimiotaxis y cambios en la expresión de componentes de la superficie celular. De hecho, la tumorigénesis es a menudo conceptualizada y resumida en una serie de etapas entre las que se pueden distinguir: la angiogénesis, la extravasación, la invasión, y la colonización. La angiogénesis constituye un paso central en la tumorigénesis dado que sostiene el crecimiento y la diseminación metastásica

La Acetilcolina (Ac) es uno de los neurotransmisores más importantes tanto en el sistema nervioso central como periférico. Puede activar dos tipos de receptores: nicotínicos y muscarínicos (RM), (1). Se han descrito 5 subtipos de RM: M1-M5. La Ac puede regular funciones celulares básicas como la expresión de genes, la proliferación, la diferenciación, la organización del citoesqueleto, el contacto célula-célula, la locomoción, la migración, etc.

Se ha demostrado que la expresión de RM está significativamente aumentada en células tumorales de distintos tipos como las de colon y mama. Su activación promueve la proliferación y la angiogénesis, las que a su vez potencian el crecimiento tumoral (2). En nuestro laboratorio hemos realizado importantes contribuciones demostrando la implicancia de la funcionalidad de los RM en las células tumorales de mama. Describimos la sobreexpresión de receptores M2 y M3 en muestras quirúrgicas de tumores de mama humana y ausencia de los RM en tejido normal de la misma

glándula. Asimismo, la expresión de estos receptores es mayor cuanto mas agresivo e invasivo es el tumor (3). Evidenciamos que la activación de la señalización a través de los RM en la línea celular MCF-7, derivada de un carcinoma ductal de mama humana que sobreexpresa los subtipos 3 y 4 de RM, estimula la proliferación y migración celular fundamentales en la progresión tumoral. En este sentido, describimos que el agonista colinérgico carbacol (CARB) promueve significativamente la proliferación y migración de las células MCF-7 y que dicho efecto se revierte en presencia del antagonista no selectivo atropina (AT) (4). Asimismo, hemos demostrado la ausencia de RM tanto en muestras de tejido normal de glándula mamaria como en la línea epitelial no tumorigénica de mama normal humana MCF-10A (5). Recientemente, describimos en ensayos in vivo un incremento en la respuesta angiogénica inducida por las células MCF-7 tratadas previamente con CARB. La misma se revirtió en presencia de AT demostrando la importancia de la señalización de los RM en dicho proceso (6).

Para poder desarrollar terapias antitumorales efectivas es de vital importancia establecer los mecanismos involucrados en la tumorigénesis. Queda claro que el proceso de transformación tumoral está compuesto por una serie de pasos complejos y multifactoriales en el que la sobre-expresión de los RM es un evento entre muchos otros. Sin embargo, es esta misma complejidad la que dificulta dilucidar el proceso y establecer terapéuticas antitumorales más efectivas. En este sentido, cobra vital importancia el poder abordar estrategias que nos permitan dilucidar el rol que tienen los distintos componentes en este proceso. Por ello, en este proyecto nos propusimos evaluar el rol de los RM sobre la malignización celular; en particular establecer si la sobreexpresión de los distintos subtipos de RM nos permite dilucidar la contribución específica de los mismos en la desregulación que lleva a una célula normal a transformarse en una célula tumoral.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de células normales y tumorales: La línea tumoral MCF-7 (ATCC HTB22), se cultivó en medio DMEM:F-12 suplementado con L-glutamina 2 mM, gentamicina 80 ug/ml y 10% de SFB. La línea epitelial no tumorigénica MCF-10A (ATCC: **CRL-10317**) y las líneas estables derivadas de ella se cultivaron en medio DMEM-F12 suplementado con hidrocortisona 0.5 mg/ml, ml; EGFh 10 ug/ml, e insulina 5 mg/ml a 37°C en atmósfera húmeda con

5% de CO₂. El medio de cultivo se reemplazará por medio fresco 3 veces/semana.

EXPRESIÓN DE LOS RM

1. Clonado de los RM en vectores de expresión: Utilizando primers específicos que incluyen sitios de corte para enzimas de restricción se amplificó por PCR las secuencias correspondientes a los subtipos de RM humanos. Las mismas se clonaron direccionalmente en el vector de expresión pcDNA3/V5 his B que incluye el gen de resistencia a ampicilina para la selección en bacterias y el antibiótico geneticina para la selección en mamíferos. La correcta incorporación del fragmento se evaluó con enzimas de restricción y la ausencia de alteraciones en la secuencia descrita se descartó por secuenciación automática de los clones positivos. Se compararon las secuencias obtenidas con las descritas en el banco de datos NCBI Reference Sequence: NM_000740 para el RM3 y NM_000741 para el RM4.

2. Transfección y obtención de líneas celulares estable: por medio de curvas de mortalidad se determinó la concentración óptima de geneticina (G418) para la selección de los clones positivos (100ug/ml) que causa la mortalidad de las células que no incorporaron el plásmido con la resistencia entre los 7-14 días de exposición al antibiótico. Se procedió a generar las líneas estables utilizando un electroporador de la marca Bio-rad con celdas de 0,2um y un protocolo de punto final (100volts, 1000uF). Se partió de 1x10 células MCF-10A en un volumen de 0,2ml de medio y utilizaron 5 ug de DNA plasmídico expresando la secuencia correspondiente a los subtipos de receptores muscarínicos (RM) RM y/o RM4 con el fin de generar una línea estable que exprese RM, otra que exprese RM y otra que exprese ambos. Como control se realizó el mismo protocolo utilizando un plásmido control que no expresa la resistencia a G418. Luego del pulso, las células fueron sembradas en placas de 6 pozos con medio completo 10% SFB y cultivadas en estufa gaseada 5% CO₂. Al día siguiente se adicionó el antibiótico de selección geneticina con el fin de eliminar aquellas células que no incorporaron el plásmido expresando el gen de la resistencia. Luego de 15 días en presencia de G418 fueron evidentes los distintos foci celulares originados a partir de las células que sobrevivieron al tratamiento de selección. Se pro-

cedió entonces a aislar y expandir las colonias resistentes. Posteriormente se comprobó la expresión de los RM de cada clone por RT-PCR, Western blot y citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos.

Funcionalidad de los RM: Se determinó el efecto de la activación de los RM con el agonistas colinérgico carbacol (CARB) y antagonistas farmacológicos (atropina: AT, o antagonistas selectivos de M3 y M4: 4-DAMP y tropicamida, respectivamente) en las dosis farmacológicas adecuadas.

Ensayo de migración celular: Se sembraron 2x10⁴ células/pozo en medio DMEN:F12 con 5% de SFB a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂. Después de que las células se adhieren son privadas de suero y luego tratadas durante 1 hora con 10 M de CARB (concentración efectiva máxima) en presencia o ausencia de los antagonistas muscarínicos AT, 4-DAMP y Tropicamida (10 M) durante 30 minutos previo al agregado del CARB. Después del tratamiento se realizó una herida en la monocapa de 4 mm, se reemplazó el medio por medio fresco sin suero y se cultivó durante 12 hs. adicionales. La migración de las células se fotografio a intervalos regulares. El área cubierta se cuantificó utilizando el programa Image J. Los resultados se expresan como el porcentaje de migración en relación al control.

Ensayo de angiogénesis in vivo: Para este ensayo se utilizaron ratones hembras NUDE, atímicos, adultos provenientes de la colonia del bioterio de la Comisión Nacional de Energía Atómica que se mantuvieron en condiciones de esterilidad siguiendo el protocolo diseñado por el Instituto Nacional de la Salud (USA) en la Guía para el cuidado y manejo de animales de laboratorio. Los animales se inocularon por vía i.d. en ambos flancos con 0,1ml de una suspensión -ajustada a una concentración de 2.10⁶/ml- conteniendo células de los clones estudiados pretratados o no con los distintos agonistas /antagonistas muscarínicos. Luego de 5 días los animales se sacrificaron y se separó por disección la piel de los tejidos adyacentes. Se observó la respuesta vascular en la cara interna de la piel con un microscopio KONUS, fotografiando digitalmente los sitios de inoculación y se cuantificó el número de vasos. La densidad de vasos (δ) se determina por la fórmula: Σ número de vasos en cada cuadrado/número total de cuadrados (7).

Crecimiento tumoral in vivo: Se administró 10 células/0,2 ml de medio DMEM en forma s.c. en el flanco izquierdo de ratones NUDE hembras. Se

evaluó el crecimiento tumoral midiendo con calibre milimétrico dos diámetros perpendiculares 4 veces por semana cada animal durante 30 días. Se calculará el diámetro promedio como $(d_1 \times d_2)^{1/2}$

RESULTADOS

Generación de líneas estables de mama humana expresando los subtipos RM y/o RM .

Las secuencias correspondientes a los subtipos RM y RM humanas se clonaron en el vector de expresión pCDNA 3.2 y se verificó su correcta inserción por restricción enzimática y secuenciación. Posteriormente, se transfectaron los mismos en la línea no tumorigénica de mama humana MCF-10A por electroporación y se cultivó en presencia del antibiótico de selección geneticina (G418) para seleccionar las células que incorporaron el plásmido y portan la correspondiente resistencia. Luego de 15 días en presencia de G418 fueron evidentes los distintos foci celulares originados a partir de las células que sobrevivieron al tratamiento de selección. La figura 1 muestra ejemplos representativos.

Se aislaron un total de 10 clones de cada línea estable generada y se procedió a evaluar la presencia de RM y/o RM en cada uno de ellos para seleccionar el clon con mejor expresión a partir de los cuales se establecieron las líneas estables. A partir de aquí se mantuvo la selección con G418 pero con una concentración de mantenimiento (50ug/ml).

Como control de la técnica, en la figura 1 también se muestran las células normales de mama MCF-10A que fueron electroporadas pero a las que no se les adicionó G418. Como se puede observar las células sobreviven al pulso eléctrico de electroporación. Además se realizó un control de selección donde las células fueron sometidas al mismo protocolo de transfección pero en presencia de un plásmido control que no expresa la resistencia al antibiótico. Como se esperaba las células no sobrevivieron luego de 15 días en cultivo en presencia de geneticina.

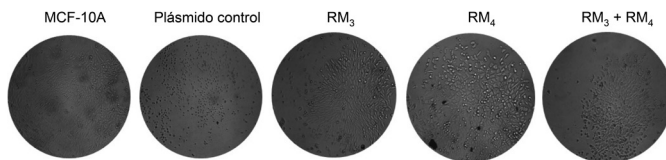


Figura 1: Obtención de clones de las distintas líneas estables MCF-10A-RM , MCF-10A-RM Y MCF-10A-RM RM . Se muestran fotos dónde se observan foci celulares representativos de las tres líneas estables generadas luego de 15 días de cultivo en presencia de geneticina (100ug/ml). Como control se muestra células normales de mama MCF-10A que fueron electroporadas pero a las que no se les adicionó G418 y células a las cuales se sometió al mismo protocolo de electroporación pero con un plásmido control que no expresa la resistencia al antibiótico.

Evaluación de la expresión de los RM en cada línea estable generada.

Se evaluó la expresión de RM y RM en los distintos clones obtenidos por citometría de flujo, inmunofluorescencia y western blot utilizando anticuerpos específicos para los 2 subtipos de receptores.

Todos los clones testeados expresaron el /los RM transfectados, por lo cual se eligió un clon de cada uno de ellos con alta expresión proteica.

En la figura 2 se muestran los datos de citometría de flujo para la expresión de RM FITC y RM PE de las tres líneas generadas. Como control negativo se utilizaron las células normales MCF-10A que no expresan RM y como control positivo se emplearon células de la línea tumoral humana MCF-7 derivada de un adenocarcinoma mamario y que expresa RM y RM . Como muestra la figura la línea MCF-10A-RM presenta una expresión de RM similar a la de línea tumoral MCF-7 y ausencia de expresión de RM como la línea parental MCF-10A. Inversamente la línea estable MCF-10A-RM no evidencia expresión de RM mientras que la expresión de RM presenta una media de fluorescencia mayor a la manifestada por MCF-7. Por su parte, la línea estable MCF-10A-RM RM presenta una alta expresión de ambos subtipos de receptores.

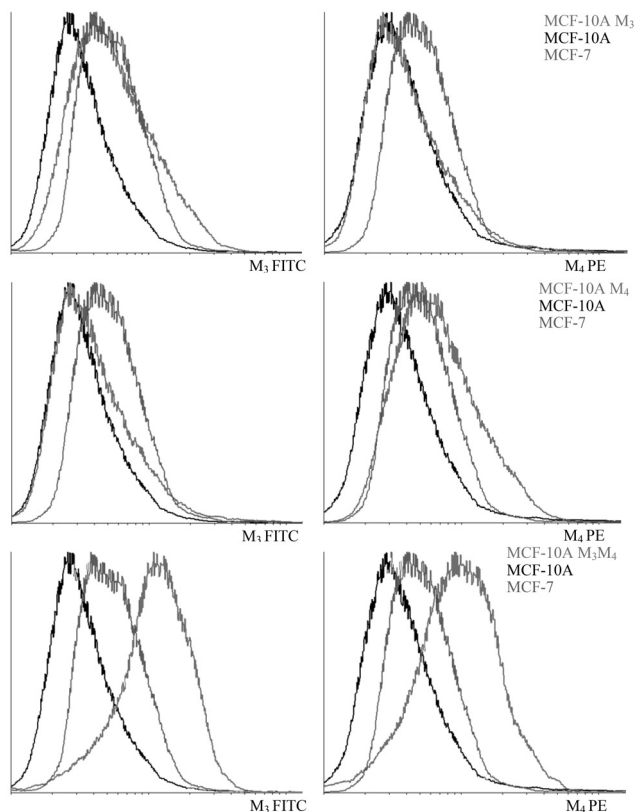


Figura 2: expresión de RM en las líneas estables generadas: Se muestra histogramas representativos de la expresión de los subtipos de RM y RM en células de las líneas estables MCF-10A-RM , MCF-10A-RM y MCF-10A-RM RM por citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos para los receptores humanos. Como control negativo se grafica la expresión de estos subtipos de RM en la línea parental MCF-10A y como control positivo se ve la intensidad de fluorescencia de las células tumorales de mama humana MCF-7.

Adicionalmente se realizó la evaluación de la expresión de los RM en las tres líneas estables generadas por técnicas de inmunocitoquímica (figura 3) y western blot (figura 4) con anticuerpos específicos. Nuevamente se pudo observar la correcta expresión de el/los subtipos de RM en las distintas líneas.

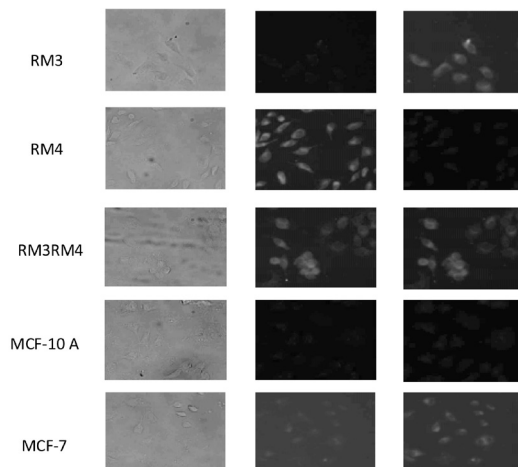


Figura 3: expresión de RM en las líneas estables generadas: Se muestra fotos representativas de la expresión de los subtipos de RM y RM en células de las líneas estables MCF-10A-RM , MCF-10A-RM y MCF-10A-RM RM por inmunocitoquímica utilizando anticuerpos específicos para los receptores humanos. Como control negativo se grafica la expresión de estos subtipos de RM en la línea parental MCF-10A y como control positivo se ve la intensidad de fluorescencia de las células tumorales de mama humana MCF-7.

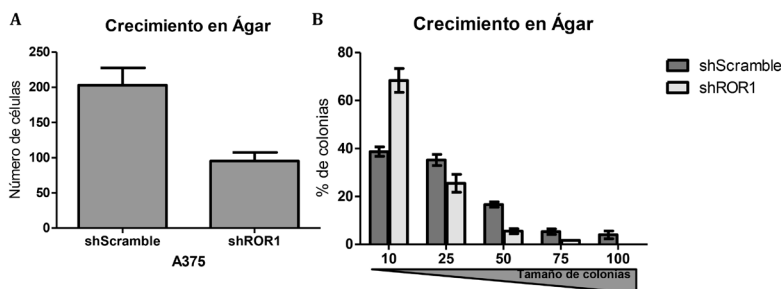


Figura 4: expresión de RM en las líneas estables generadas: Se muestran ejemplos representativos de la expresión proteica de los subtipos de RM y RM en extractos obtenidos a partir de células de las líneas estables MCF-10A-RM , MCF-10A-RM y MCF-10A-RM RM por western blot utilizando anticuerpos específicos para los receptores muscarínicos humanos. Como control negativo se muestra la expresión de estos subtipos de RM en la línea parental MCF-10A y como control positivo se ve la expresión células tumorales de mama humana MCF-7.

Efecto de la activación colinérgica sobre la progresión tumoral.

Luego de verificar la correcta expresión de los RM se procedió al estudio funcional sobre algunos parámetros de mayor relevancia durante la progresión tumoral.

En primer lugar se evaluó el efecto de la estimulación colinérgica sobre la capacidad de migración celular de las líneas estables generadas utilizando el ensayo de herida. Para ello, las células previamente privadas de suero durante 12 h fueron tratadas con el agonista colinérgico carbacol (CARB) durante 1 hora en presencia o ausencia de los antagonistas farmacológicos (atropina: AT, antagonista muscarínico no selectivo; 4-DAMP: antagonista RM y tropicamida: antagonista RM) durante 30 minutos previo al agregado del CARB. Después del tratamiento se realizó una herida en la monocapa de 4 mm, y cultivó durante 16 hs adicionales fotografiando el área de la herida a tiempo 0 y 12h. Los resultados se expresan como el porcentaje de área de la herida cubierta debido a la migración celular en relación al control a tiempo 0 para cada grupo experimental.

La figura 5 muestra que la estimulación colinérgica no tiene efecto sobre la migración celular de la línea no tumoral MCF-10A (que no expresan RM).

Al evaluar el efecto de la estimulación muscarínica sobre la capacidad de migración celular de las líneas estables generadas se observó que la misma aumenta la migración celular en la línea MCF-10 A-RM y que este efecto que revierte en presencia de AT y del antagonista selectivo 4-DAMP (fig. 1 B) indicando que el RM3 es funcional y su activación modula la actividad celular. De forma similar, la estimulación colinérgica aumentó la migración celular en la línea MCF-10 A-RM y el efecto que revierte en presencia de AT y del antagonista selectivo Tropicamida (figura 1 C), mientras que el tratamiento con carbacol incrementa la migración celular en la línea MCF-10 A-RM RM y este efecto que revierte en presencia tanto de AT como de los antagonistas selectivos 4-DAMP y Tropicamida (Figura 1 D). En conjunto, los resultados muestran que las líneas estables generadas expresan RM funcionales y que la señalización mediada por estos modula la capacidad de migración celular.

Adicionalmente se cuantificó el efecto de la estimulación colinérgica de los RM sobre la respuesta angiogénica inducida in vivo por las **células de las líneas estables generadas**. Para ello se utilizaron ratones hembra NUDE atímicos adultos. Las células MCF-7 provienen de un tumor estrógeno dependiente que expresa receptores para esta hormona, para poder

evaluar el crecimiento tumoral se administraron 2 μ g/ratón de 17 β -estradiol, previamente a la inoculación de las células tumorales. El resto de las células de las distintas líneas estables generadas se inocularon sin estrogeneizar a los ratones.

Se inocularon los ratones en ambos flancos por vía i.d. con 2x10 células/0,1ml. Luego de 5 días los animales se sacrificaron y se separó por disección la piel de los tejidos adyacentes. Se observó y fotografió la densidad de vasos en la cara interna de la piel con un microscopio KONUS, posteriormente la imagen se proyectó sobre una cuadrícula a escala. La densidad de vasos (δ) se determinó por la fórmula: Σ número de vasos en cada cuadrado/número total de cuadrados. La figura 6 muestra fotos representativas de la respuesta neovascular obtenida en los distintos grupos experimentales. Como se observa en el gráfico las tres líneas estables generadas expresando RM y/o RM incrementaron la angiogénesis con respecto a la línea no tumoral MCF-10A de la que derivan y la densidad de vasos fue similar a la obtenida en el ensayo por la línea tumoral de mama MCF-7.

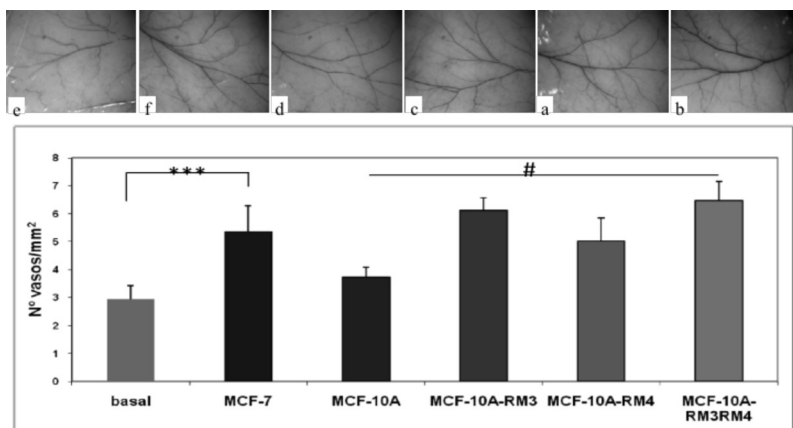


Figura 6: Ensayo de angiogénesis in vivo. Fotos representativas del nivel de vascularización presente en las pieles de los ratones nude inoculados con MCF-7 (b), MCF-10A (c), MCF-10A-RM3 (d) y MCF-10A-RM4 (e) y MCF-10A-RM3RM4 (f). En primer lugar se muestra el grado de vascularización en condiciones basales (a). En el gráfico se muestra la cuantificación del N° de vasos/mm para los distintos grupos experimentales. Los valores representan el promedio $\pm$ E.S. de 3 experimentos realizados por triplicado. *** $p < 0.001$ vs Basal, # $p < 0.001$ vs MCF-10 A

Los resultados muestran que los RM expresados en las distintas líneas estables son funcionales y concluimos que la activación de los RM por la acetilcolina endógena promueve la respuesta neovascular inducida por las células de estas líneas de manera similar que la generada por la línea tumoral MCF-7.

Por último realizamos ensayos de crecimiento tumoral *in vivo*. Para ello se administraron 10 células/0,1 ml de medio DMEM sin suero en forma s.c. en el flanco izquierdo de ratones ratones hembras NUDE . Se evaluó el crecimiento tumoral midiendo con calibre milimétrico dos diámetros perpendiculares 3 veces por semana a cada animal durante 30 días. Se calculó el volumen promedio como $(d1 \times d2)/2$. De acuerdo con los datos previos de bibliografía la línea MCF-10A no desarrollo tumores durante el ensayo *in vivo*. Las tres líneas estables generadas transfectando los RM y/o RM fueron capaz de crecer formando tumores sólidos de aspecto compacto y lobular. De las tres líneas MCF-10A-RM4 presentó una mayor cinética de crecimiento (Figura 7).

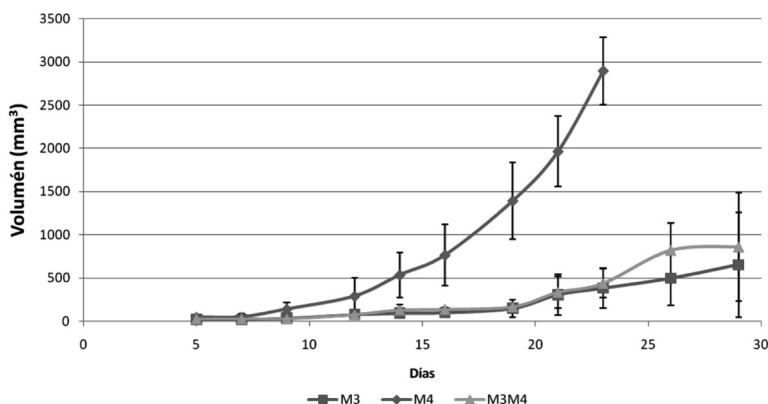


Figura 7: Ensayo de crecimiento tumoral de las líneas estables generadas expresando RM y/o RM . Ratones NUDE hembras fueron inoculados en el flanco izquierdo con 10 células/0,1 ml de cada una de las líneas estables. Se evaluó el crecimiento tumoral midiendo con calibre milimétrico dos diámetros perpendiculares. Se calculó el volumen promedio para cada uno de los grupos experimentales. La medición de los tumores se realizó 3 veces por semana a cada animal durante 30 días.

Como hemos señalado anteriormente la señalización mediada por los RM tiene un gran impacto sobre la célula y es capaz de modular funciones celulares básicas como la proliferación, la diferenciación, el contacto célula-célula y la reorganización del citoesqueleto. En conjunto, nuestros resultados indican que la desregulación de la expresión de los RM lejos de ser un evento menor juega un rol de importancia durante el proceso de transformación celular hacia un fenotipo tumoral.

ABSTRACT

Muscarinic receptors (MR) belong to the G-protein-coupled receptor family, and are extensively expressed in most mammalian cells. They are constituted by seven transmembrane helices. Five different MR were identified in mammals: M₁-M₅.

Breast cancer is the most frequent cancer in women. In the last years, our experimental data suggest that the MR could influence tumor growth. In this sense, we have previously reported that MR, which are absent in normal human mammary tissue, are strongly expressed in tumor samples surgically obtained from breast cancer patients. In line with these previous results, we demonstrated that MCF-7 cells derived from a human mammary adenocarcinoma express M₁ and M₂ receptor subtypes, while non tumorigenic MCF-10A cells did not exhibit MR expression at all. It has also been reported that MR are linked to different steps of tumor progression, such as cell migration, proliferation and angiogenesis. This could be assigning a central role to MR as promoters of malignant progression. In this work, we investigate whether changes in the level of expression of MR are involved in the pathophysiology of cancer. Non tumorigenic MCF-10A cells were transfected with pCDN3 MR and/or MR plasmid. The activation of MR₃ and/ or MR₄ subtypes regulates both the *in vitro* cellular migration levels and the induced angiogenesis and cellular growth *in vivo*.

Together these results suggest that the deregulation of cellular MR expression it is a very important step in the malignization process leading a normal cell to become a tumor cell.

REFERENCIAS

1. Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F, Kirkpatrick CJ. The biological role of non-neuronal acetylcholine in plants and humans. *Jpn J Pharmacol*. 2001 Jan;85(1):2-10.
2. Shah N, Khurana S, Cheng K, Raufman JP. Muscarinic receptors and ligands in cancer. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009; 296 (2): C221-32.
3. Fiszman, G. & Sales, M.E. Antibodies against muscarinic receptors in breast cancer: agonizing tumor growth. *Curr. immunol. rev.* 4(3), 1-7. 2008.
4. Pelegrina LT, Lombardi MG, Fiszman GL, Azar ME, Morgado CC, Sales ME. Immunoglobulin G from breast cancer patients regulates MCF-7 cells migration and MMP-9 activity by stimulating muscarinic acetylcholine receptors. *J Clin Immunol*. 2013 Feb;33(2):427-35.
5. Lombardi MG, Negroni MP, Pelegrina LT, Castro ME, Fiszman GL, Azar ME, Morgado CC, Sales ME. Autoantibodies against muscarinic receptors in breast cancer: their role in tumor angiogenesis. *PLoS One*. 2013;8(2):e57572
6. Davel LE, Rimmaudo L, Español A, de la Torre E, Jasnís MA, Ribeiro ML, Gotoh T, de Lustig ES, Sales ME. Different mechanisms lead to the angiogenic process induced by three adenocarcinoma cell lines. *Angiogenesis*. 2004; 7 (1): 45-51.
- 7.

CARACTERIZACIÓN DE LAS POBLACIONES INHIBITORIAS/ REGULATORIAS EN UN MODELO TUMORAL. ESTUDIO DEL ROL DE LOS LINFOCITOS B.

Titular: Dra. Andrea F. Maglioco

Colaboradora: Dra. Gabriela Camicia

Instituto de Medicina Experimental-CONICET. Academia Nacional de Medicina.
Buenos Aires. Argentina.

RESUMEN

Los linfocitos B han sido caracterizados por su capacidad secretora de anticuerpos y por su función como células presentadoras de antígeno, contribuyendo en forma positiva al desarrollo de una respuesta inmune tanto humoral como celular.

En los últimos años, se ha descripto la existencia de células B involucradas en la inhibición de la respuesta inmune, caracterizadas principalmente por ser secretoras de IL-10. Estas células se estudiaron ampliamente vinculadas a enfermedades autoinmunes pero poco se sabe sobre su rol en cáncer. En un trabajo previo, demostramos que la progresión del fibrosarcoma murino MCC induce un marcado incremento de linfocitos B y linfocitos T regulatorios en ganglios drenantes del tumor. Más aún, la depleción de ambas poblaciones mediante drogas quimioterapéuticas aumenta la tasa de regresión tumoral inducida por un tratamiento inmunológico; sugiriendo que la presencia de linfocitos B y T regulatorios en el entorno del tumor favorecerían su crecimiento. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar las células B de ratones portadores y profundizar en su rol durante el crecimiento tumoral en relación a otras células del sistema inmune. Demostramos que las células B de ratones portadores expresan IL-10 y Granzima B y tienen la capacidad de inhibir una proliferación alogeneica. Además mediante la administración de anti-CD20 (Biogen Idec) observamos un retardo significativo en el crecimiento tumoral acompañado de un aumento en el número de células activadas (CD8 IFN γ y CD8 CD25) y una disminución en el número de células T regulatorias (CD4 Foxp3) presentes en los ganglios drenantes. Los resultados indican que las células B cumplen un rol inhibitorio en nuestro sistema propiciando el crecimiento tumoral y destacan la importancia de éstas células al momento de diseñar protocolos inmunoterapéuticos.

INTRODUCCIÓN

Los linfocitos B han sido caracterizados por su capacidad secretora de anticuerpos y por su función en la presentación antigénica a células T contribuyendo en forma positiva al desarrollo de una respuesta inmune tanto humoral como celular. En los últimos años, se ha descrito también la existencia de células B con función regulatoria (inhibitoria de la respuesta inmune). Éstas se caracterizan principalmente por ser secretoras de IL-10, una citoquina que entre otras funciones, disminuye la expresión de moléculas coestimuladoras en células presentadoras de antígeno, afectando así la respuesta inmune desde su inicio. Las células B regulatorias han sido detectadas tanto en humanos como en distintos modelos experimentales con un fenotipo más determinado en estos últimos (CD5 B220, CD1d CD5 CD19). Asimismo, se ha descrito que estimulan el desarrollo de las células T regulatorias (CD4 CD25 Foxp3) involucradas en la inhibición de la proliferación, diferenciación y activación de células T efectoras.

En particular en cáncer, el rol de los linfocitos B es controvertido. Las células B son requeridas para la óptima activación de células T CD4 y T CD8 durante la respuesta antitumoral. La progresión de ciertos cánceres humanos y murinos induce el aumento de linfocitos B, tanto a nivel de órganos linfáticos como dentro del propio tumor. Originalmente se consideró la presencia de células B como un indicador de pronóstico positivo, no sólo por la potencial protección que otorgaría la producción de anticuerpos tumor-específicos sino por la cooperación con las células T citotóxicas. Sin embargo, otra serie de estudios sugiere que pueden ejercer un rol inmunosupresor, generando tolerancia al tumor y contribuyendo al escape tumoral.

En estudios previos hemos analizado el efecto del crecimiento tumoral sobre el sistema inmune del portador utilizando un fibrosarcoma murino inducido por metilcolantreno (MCC). Demostramos que la progresión del tumor induce un marcado incremento de linfocitos B y linfocitos T regulatorios (T reg) presentes en el ganglio drenante. Más aún, la depleción de ambas poblaciones mediante drogas quimioterapéuticas lleva a un aumento de la tasa de regresión tumoral inducida por un tratamiento inmunológico; sugiriendo que la presencia de linfocitos B y T reg en el entorno del tumor favorecerían el crecimiento tumoral. En efecto, muchos autores demostraron que el aumento de T reg constituye uno de los mecanismos utilizados por el tumor para suprimir la respuesta inmune antitumoral pero, como describimos previamente, el papel de los linfocitos B en la inmunidad tumoral

podría ser dual y aún no se encuentra totalmente dilucidado. ***Durante este trabajo se estudiaron las características fenotípicas y funcionales de los linfocitos B y su rol en la respuesta antitumoral.***

RESULTADOS

Basándonos en estudios previos sobre la inmunogenicidad del tumor MCC a lo largo de su desarrollo, establecimos 3 estadios tumorales: NP o tumor no palpable (48 hs post inóculo tumoral), INM o fase de inmunogenicidad (100-400 mm³), TOL o fase tolerogénica (800-1200 mm³). El tumor MCC inoculado en forma subcutánea drena principalmente al ganglio inguinal y a los ganglios axilares. Centramos nuestros estudios en los ganglios linfáticos inguinales drenantes del tumor (NLDT).

La presencia del tumor MCC induce cambios en el sistema inmune del portador. Se observaron aumentos en el número de células totales presentes en los ganglios. En particular la población que más aumentó durante el crecimiento tumoral fue la de linfocitos B. Estas células presentaron un fenotipo activado a las 48 hs post-inóculo tumoral (NP), evidenciado por un aumento en la expresión de la molécula CD40 en membrana. Más tardíamente, cuando el tumor ya se encuentra establecido (INM y TOL), detectamos un aumento en la expresión de MHCII que no se acompañó de diferencias en la expresión de moléculas coestimuladoras (Figura 1). Durante todo el crecimiento tumoral no observamos diferencias significativas en la expresión de MHCI en membrana de estos linfocitos.

Además, hallamos que los linfocitos B son productores de IL-10 (Figura 2) y Granzima B (Figura 3) en estadios avanzados del desarrollo tumoral. La IL-10 es una citoquina con múltiples funciones en distintos tipos celulares. En particular, en la generación de una respuesta inmune, altera la funcionalidad de las células presentadoras de antígenos al inhibir la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y reducir la expresión de MHCII y moléculas coestimuladoras y de adhesión. En cuanto a Granzima B, su función asociada a linfocitos B aún está discutida pero podría relacionarse con la inhibición de la proliferación de células T.

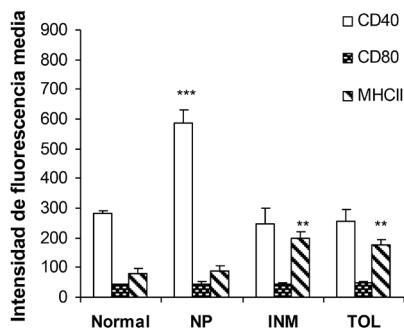


Figura 1: Intensidad de fluorescencia media de las moléculas CD40, CD80 y MHCII presentes en linfocitos B de ganglio. Las barras muestran la media $\pm$ SD de un experimento representativo ($n = 3 - 5$).

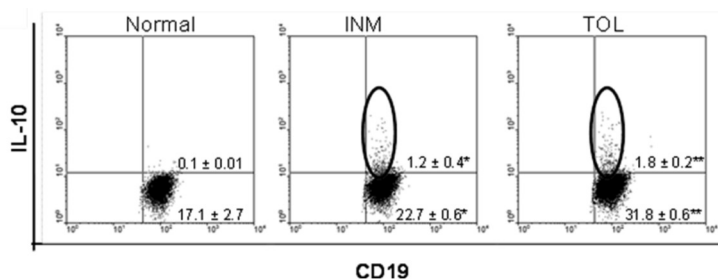


Figura 2: Expresión intracelular de IL-10. Se analizó por citometría de flujo la presencia intracelular de IL-10 en linfocitos B de ganglio. Se muestran Dot plots representativos. Se indican porcentajes de células en ganglio total ($n=4$ ratones por grupo).

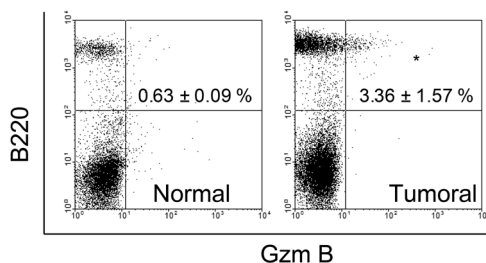


Figura 3: Expresión de Granzima B. Se analizó por citometría de flujo la presencia intracelular de Granzima B en linfocitos B de ganglio. Se muestran Dot plots representativos. Se indican porcentajes de células en ganglio total ($n=3-4$ ratones por grupo).

Debido a los cambios detectados en el fenotipo de los linfocitos B durante el crecimiento tumoral, nos propusimos depletar estas células *in vivo* y realizar distintos ensayos a fin de evaluar el rol de las células B en la respuesta antitumoral. Utilizamos un anticuerpo anti-CD20 (clon 18B12) **gentilmente otorgado por Biogen Idec**. Evaluamos la presencia de células B (células CD19) en sangre periférica durante los 14 días posteriores a la administración de anti-CD20 ó anti-IgG como control (**Figura 4**). Al mismo tiempo, analizamos la curva de crecimiento tumoral y observamos que los tumores de los ratones a los que se les administraba anti-CD20 crecían más lento que aquellos a los que se les administraba IgG, indicando cierta acción inhibitoria de las células B sobre la respuesta inmune antitumoral (**Figura 5**). En este sentido, células B aisladas de ratones portadores demostraron ser capaces de inhibir una proliferación alogeneica (no se muestra).

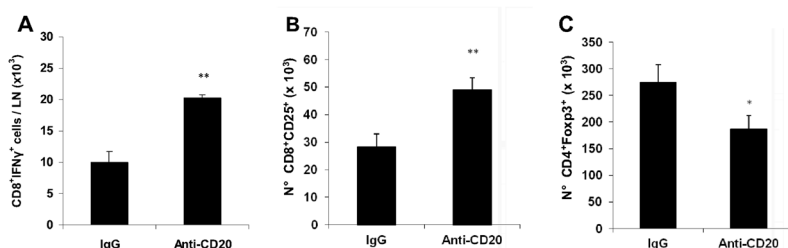


Figura 4: Efecto de la administración de anti-CD20 sobre el porcentaje de células B presentes en sangre periférica. Se muestran histogramas representativos de la cinética de depleción de células B en ratones portadores.

Completamos nuestro estudio analizando el efecto de la depleción de células B sobre las poblaciones efectoras de los ganglios drenantes del tumor. Observamos que la presencia de células B durante el crecimiento tumoral disminuye el número de células CD8 expresando IFN γ y CD25 (marcadores de activación) a la vez que aumenta el número de células CD4 Foxp3 (regulatorias- Figura 6).

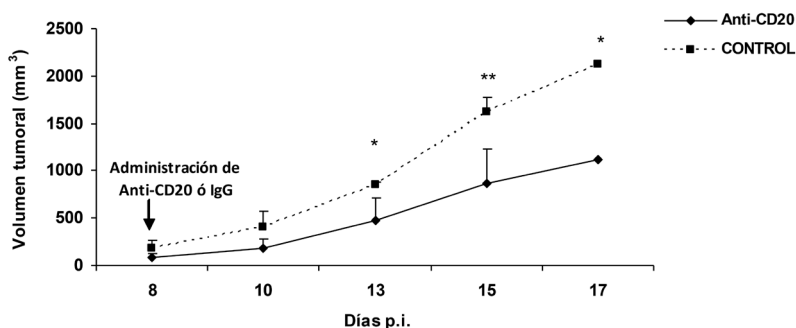


Figura 5: Curva de crecimiento tumoral en ratones portadores depletados de células B (anti-CD20) o en ratones portadores control (IgG). Se muestra un experimento representativo (n=6).

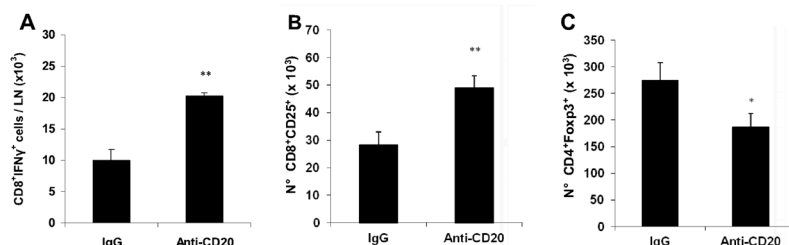


Figura 6: Cambios fenotípicos detectados en las células efectoras presentes en ganglios drenantes. Las barras muestran el número de células activadas (CD8 IFN γ y CD8 CD25 -A,B) y regulatorias (CD4 Foxp3,C) presentes en ganglio drenante (n=3-4 ratones por grupo).

CONCLUSIÓN

Nuestros resultados muestran que las células B actúan negativamente sobre la respuesta antitumoral, impidiendo la activación de células efectoras a la vez que inducen un aumento de células T regulatorias en los ganglios drenantes donde debería iniciarse la respuesta inmune frente al tumor. Los

datos presentados en este informe junto a los ya publicados por el grupo nos permiten señalar que las células B, al igual que como ya es ampliamente establecido para las células T regulatorias, deben ser tenidas en cuenta durante el diseño de inmunoterapias.

REFERENCIAS

1. Lebien T et al. 2008. *Blood*, 112: 1570.
2. Coughlin C et al. 2004. *Blood*, 103: 2046.
3. Crawford, A et al. 2006. *J Immunol*, 176: 3498.
4. Mizoguchi A et al. 2006. *J Immunol*, 176: 705.
5. Bouaziz J et al. 2008. *Immunol Rev*, 224:201.
6. Spencer N et al.1997. *Int Immunol*, 745.
7. Yanaba K et al. 2008. *Immunity*, 28: 639.
8. Matsushita T et al. 2008. *J Clin Invest*, 118: 3420.
9. Yanaba K et al. 2009. *J Immunol*. 182: 7459.
10. Zhou G et al. 2007. *J Immunol*, 178: 2155.
11. Amu S et al. 2010. *J Allergy Clin Immunol*, 125: 1114.
12. Di Lillo D et al, 2010. *J Immunol* 184:4006.
13. Lores B et al, 1998. *Int J Mol Med* 1(4):729.
14. [Nelson B](#), 2010. *J Immunol* 185(9):4977.
15. DiLillo D et al, 2009. *J Immunol* 182: Abstract 88.27.
16. Qin Z et al, 1998. *Nat Med* 4 (5): 627.
17. Maglioco A et al, 2011. *Cancer Immunol Immunother*, 60(3):389.
18. Di Lillo D et al, 2010. *Ann NY Acad Sci*, 1183:38
19. Lindner S et al, 2013. *Cancer Res*, 73(8):2468.

EFEECTO DEL ÁCIDO TRANS-RETINOICO COMO TRATAMIENTO UTILIZADO EN UN MODELO MURINO DE INMUNOSUPRESIÓN ASOCIADO A PROCESOS INFECCIOSOS

Daiana Martire Greco

Instituto de Medicina Experimental. IMEX-CONICET.

Academia Nacional de Medicina

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La sepsis es una patología relacionada a una infección con bacterias Gram negativas. Suceden dos etapas, la primera donde hay una respuesta inflamatoria exacerbada y la segunda que termina con un estado de inmunosupresión donde se registran la mayoría de los casos fatales. Los lipopolisacáridos (LPS) son glicolípidos presentes en la membrana de estas bacterias siendo los más potentes inmuno estimuladores de la respuesta inflamatoria.

El fenómeno de inmunosupresión de la sepsis ha sido abordado a nivel experimental a través de la inducción de tolerancia a LPS, siendo éste un modelo ampliamente aceptado ya que representa distintos aspectos de la inmunosupresión asociada a la sepsis como alteraciones en la función de los linfocitos, monocitos y una menor respuesta inmune humoral primaria (*Rear-te, B. y col. Clin Exp Immunol, 159(2):208-16*)

De esta forma, una posible estrategia consistiría en la administración de drogas que reviertan este estado de inmunosupresión. Los mecanismos celulares asociados a esta inmunosupresión no han sido elucidados hasta el momento, pero se hipotetiza que distintos tipos celulares con potencial inmunosupresor como son las células mieloides supresoras (conocidas como Myeloid-Derived Supresor Cells, MDSC) podrían ser activos participantes en el mantenimiento de la inmunosupresión asociada a los procesos sépticos. Esta población posee dos subpoblaciones diferentes que expresan el CD11b pero poseen distinta expresión del marcador Gr-1, high y low. Los efectos inhibitorios de las MDSC sobre las células T están mediados por dos enzimas del metabolismo de la arginina, la forma inducible de la óxido nítrico sintetasa (iNOS), que cataliza la oxidación de la L-arginina (L-Arg) generando óxido nítrico (ON) y citrulina, y la Arginasa-1 (Arg1), que convierte la L-Arg en Urea y L-ornitina (*Bronte, V. y col. Trend Immunol. 2003;24(6):302-6*). El Ácido

All-Trans Retinoico (ATRA) es un derivado de la vitamina A con conocidos efectos inmunomoduladores. Entre ellos, se ha descrito que el ATRA promueve la respuesta inmune humoral frente a patógenos, reduce la mortalidad frente a determinadas infecciones (Semba, R.D y col. *Proc. Nutr. Soc.*, 129, 783–791), diferencia progenitores mieloides (MDSC) a fenotipos maduros (Gabrilovich, D.I y col. *Cancer Res.* 15;66(18):9299-307.) y refuerza el sistema inmunológico (Stephensen, C.B. *Annu. Rev. I. Nutr.*, 2001. vol 21:167-192;)

Por lo descrito anteriormente nuestra **hipótesis de trabajo** es que la intervención farmacológica con drogas inmunomoduladores, como el ATRA, que tengan efectos sobre la población celular de MDSC o sobre su función podría mejorar la inmunocompetencia en estados de inmunosupresión asociados a fases tardías de la sepsis.

El **objetivo general** de este proyecto fue determinar el efecto del ATRA sobre las MDSC como estrategia de reversión de la inmunosupresión mediada por LPS.

RESULTADOS

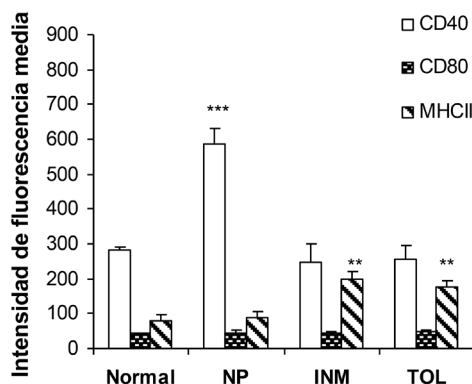
Trabajamos con un modelo murino aplicando dosis crecientes de LPS i.p (5-100 ug/día/ratón) durante 20 días en paralelo con ATRA (500 ug/día/ratón) (grupo IS+ATRA) o vaselina (vehículo) (grupo IS) vía oral. Al grupo Control se le administró solución fisiológica i.p o ATRA sólo (grupo ATRA)

En la primera etapa del proyecto se midió la respuesta inmunológica mediada por anticuerpos y la variación de la población de las células dendríticas (CDs) (CD11c+) en ratones inmunosuprimidos por LPS y tratados con ATRA.

En primera instancia se observó mediante un ensayo de hemoaglutinación en los animales tratados con ATRA respecto a los IS un restablecimiento parcial del título de anticuerpos frente a un antígeno T-dependiente (Figura 1).

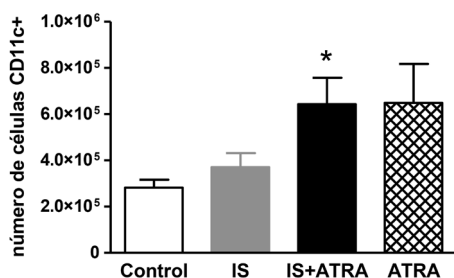
El resultado obtenido anteriormente demostró que el ATRA reestableció parcialmente la respuesta inmune humoral primaria ya que se observó un aumento en el título de anticuerpos anti-glóbulo rojo.

Además se estudió mediante citometría de flujo a la población de células dendríticas (CDs, CD11c+) las cuales intervienen en la respuesta inmune humoral (Figura 2).



* vs Control, # vs IS, $p < 0,05$

Figura 1: Se muestra el título de anticuerpos obtenido en un ensayo de hemoaglutinación utilizando los sueros de animales luego de 7 días de ser inoculados intraperitonealmente con glóbulos rojos de carnero.



* vs Control, $p < 0,05$

Figura 2: Se representa el número absoluto de CDs (CD11c+). Este número se obtuvo utilizando el % de células CD11c+ obtenido por citometría de flujo y los valores de los números de células totales obtenidos por recuento en cámara de Newbauer.

Este resultado está indicando que el ATRA aumentó el número de células dendríticas CD11c+, probablemente asociadas a contribuir al aumento del título de anticuerpos observados anteriormente.

Luego continuamos nuestro estudio sabiendo que en la etapa de inmunosupresión existe una disminución marcada del número de linfocitos, en este sentido se midieron los efectos del ATRA en cuanto a la modulación de distintas poblaciones celulares en los ganglios de los ratones de los distintos grupos.

Con el objetivo de entender los mecanismos por el cual el ATRA modificaba la respuesta inmune funcional de ratones IS se estudiaron distintas poblaciones celulares del ganglio (Figura 3).

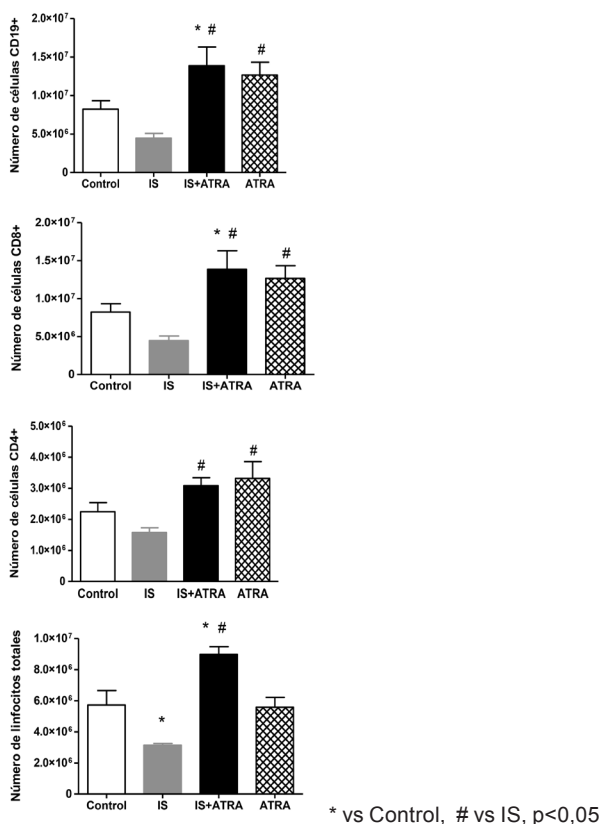


Figura 3: Números absolutos de linfocitos CD4+, CD8+, CD19+ y número de linfocitos totales medidos por citometría de flujo en ganglios de animales grupos controles, IS, IS+ATRA y ATRA

El ATRA aumenta significativamente el número de poblaciones de linfocitos CD8+, CD4+ y CD19+, los cuales estaban disminuídos en el grupo de ratones IS, esto se correlaciona con la disminución en el recuento de linfocitos totales en el ganglio. De esta forma el ATRA estaría reestableciendo el número de linfocitos y de esta forma también contribuyendo a aumentar el título de anticuerpos en el ratón inmunosuprimido.

Además se midió el número de la población de células supresoras MDSC en ganglio de animales IS (Figura 4). Se observó que estaban incrementadas significativamente respecto al grupo control, sin embargo no se encontraron diferencias entre el grupo IS y el tratamiento con el ATRA en ambas poblaciones de células MDSC Gr-1⁺ CD11b⁺ y Gr-1⁺ CD11b⁺.

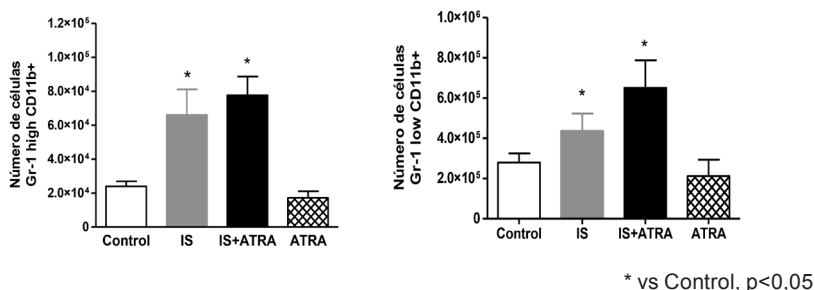


Figura 4: Los gráficos de barras muestran los números absolutos obtenidos por citometría de flujo de la población de células MDSC (Gr-1 high/low, CD11b+)

Estos resultados nos permitieron observar que el ATRA aumenta el número de linfocitos pero no modifica los valores de células MDSC respecto a los animales inmunosuprimidos.

Por otro lado se ha descrito un aumento de MDSC en la etapa de inmunosupresión, las cuales podrían estar interviniendo probablemente inhibiendo la proliferación de linfocitos T. Por lo tanto nuestro siguiente objetivo fue estudiar si el ATRA puede revertir esta disminución de la proliferación de los linfocitos T en animales inmunosuprimidos (IS), modulando de alguna forma (en número o actividad) la población de células MDSC.

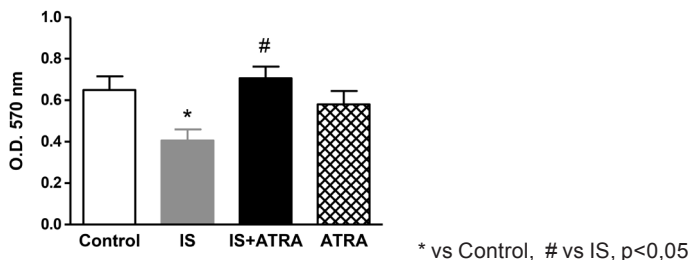


Figura 5: Se muestra la proliferación de linfocitos T estimulados con concanavalina A (estímulo linfocito T-específico), entre los distintos grupos. Las células proliferando se midieron utilizando MTT, el cual se incorpora a las mitocondrias de las células proliferando dando un color violáceo en el medio celular cuya densidad óptica (DO) se leyó a 570nm.

Observamos que el tratamiento con el ATRA a los ratones IS logra reestablecer los valores de proliferación de los linfocitos T a valores cercanos a los del grupo Control (Figura 5).

El ATRA restituye totalmente la disminución de la proliferación de linfocitos T observados en el grupo IS.

En concordancia con lo mostrado anteriormente observamos que efectivamente la población de células supresoras MDSC son las que estarían interviniendo en la disminución de la proliferación de linfocitos T en los animales IS. Esto fue comprobado al realizar un ensayo de depleción para células Gr-1+ utilizando beads magnéticas y un anticuerpo anti-Gr-1 y midiendo luego, en la población depletada, la proliferación de linfocitos T (Figura 6).

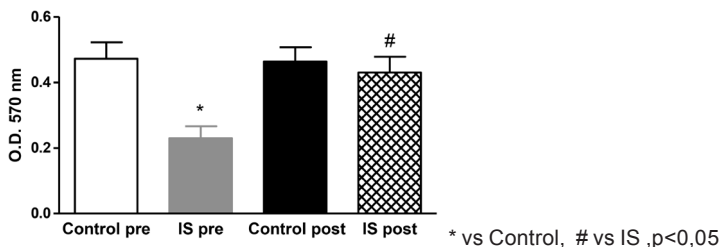


Figura 6: Se muestra en el grafico de barras la proliferación de células antes y luego de depletar las células Gr-1 con beads magnéticas para los distintos grupos.

La depleción de las células MDSC reestableció la proliferación de linfocitos T en los ratones inmunosuprimidos

Hasta ahora hemos visto que el tratamiento con ATRA en animales inmunosuprimidos modula la población de linfocitos, aumentando sus valores y también permite un reestablecimiento total de la proliferación de linfocitos T, sin modificar la población de células supresoras MDSC. Por lo tanto nuestro objetivo siguiente consistió en estudiar si el ATRA tiene efectos sobre estos mediadores inhibitorios óxido nítrico (ON) y Arginasa-1 presentes en cultivos de linfocitos donde los mismos presentan una menor proliferación. Para ello medimos la presencia de ON en cultivos de proliferación de linfocitos T, utilizando como técnica de medición del ON la de Griess (Figura 7).

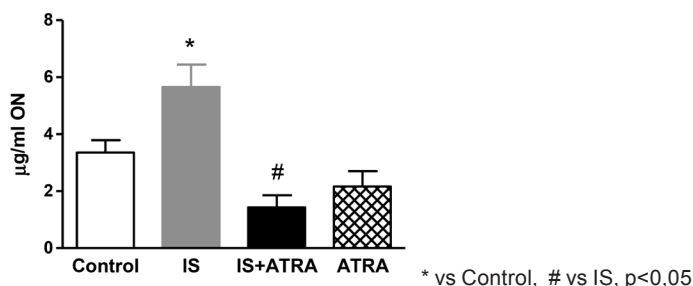


Figura 7: Este gráfico representa los $\mu\text{g/ml}$ de óxido nítrico medidos por la técnica de Griess, en los distintos grupos de ratones. Se midió la densidad óptica del producto coloreado y luego mediante una curva estándar se realizó la conversión de DO a concentración $\mu\text{g/ml}$ de óxido nítrico.

El tratamiento con ATRA en los ratones IS disminuyó los elevados niveles de ON en el sobrenadante de los cultivos de proliferación.

Para completar el estudio, medimos la actividad de la enzima Arginasa-1 en células de ganglio de los cultivos de proliferación de linfocitos T y observamos que efectivamente el tratamiento con el ATRA a los ratones inmunoprimidos disminuyó los valores elevados de la actividad de Arginasa-1 (Figura 8).

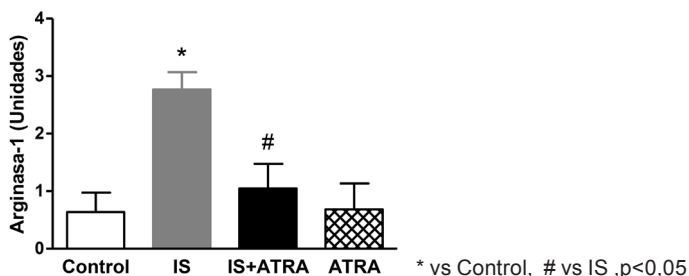


Figura 8: Valores de Arginasa-1. Se define a 1 Unidad de Arginasa-1 como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la formación de urea en 60 minutos.

El tratamiento con el ATRA en los ratones IS disminuyó los elevados niveles de actividad de Arginasa-1.

CONCLUSIÓN

En el transcurso de este trabajo se pudo poner a punto y caracterizar el modelo de inmunosupresión murino por LPS. Utilizando este modelo se observó que el tratamiento con la droga inmunomoduladora ATRA modificó el escenario inmunológico alterado en los ratones inmunosuprimidos.

Por un lado, el reestablecimiento de la respuesta inmune humoral primaria y el aumento de la proliferación de linfocitos T confirmaron que el ATRA posee efectos que modifican la respuesta inmunológica funcional en los ratones del grupo IS. Posteriormente al estudiar y observar aumentos significativos en las distintas poblaciones celulares de linfocitos CD4+, CD8+, CD19+ y células dendríticas CD11c+ respecto al grupo IS, permitió determinar que la administración de ATRA a animales IS altera el número celular de distintas poblaciones, probablemente contribuyendo de esta manera a mejorar la defensa inmunológica. Paralelamente se pudo registrar la capacidad de esta droga de disminuir la actividad supresora de la población celular MDSC, específicamente disminuyendo la producción de ON y Arginasa-1, pero sin modificar su número celular respecto a los ratones IS.

Estos resultados, nos alientan a decir que el ATRA reestablece algunos parámetros inmunológicos alterados en la inmunosupresión por LPS y que, probablemente estos efectos estén mediados en parte por su interacción con

la población de MDSC al disminuir su actividad supresora. Estudios posteriores permitirán profundizar sobre este mecanismo de acción y entender como es la interacción de esta droga con la población MDSC, reforzando la posibilidad de utilizar al ATRA como tratamiento paralelo en pacientes que se encuentren en un estado de inmunosupresión asociado a etapas tardías de la sepsis.

RESUMEN

La inmunosupresión derivada de los procesos sépticos está asociada a la disminución de la proliferación de los linfocitos (Li) T. A su vez, las células mieloides inmaduras supresoras (MDSC) Gr-1+ CD11b+ participan en este proceso mediante la producción de la óxido nítrico (ON) y la activación de la Arginasa 1 (Arg1). El Ácido *Trans*-Retinoico (ATRA) es una droga inmunomoduladora y tiene efectos sobre distintas poblaciones celulares, muchas veces modulando su sobrevivencia. El **objetivo general** de este proyecto fue determinar el efecto del ATRA sobre las MDSC como estrategia de reversión de la inmunosupresión mediada por LPS. Trabajamos con un modelo murino aplicando dosis crecientes de LPS i.p. (2-100 ug/día/ratón) durante 20 días en paralelo con ATRA (500 ug/día/ratón) (grupo IS+ATRA) o vaselina (vehículo) (grupo IS) vía oral. Al grupo Control se le administró solución fisiológica i.p o ATRA sólo vía oral (grupo ATRA). La proliferación T fue determinada en cultivos de células de ganglio en respuesta a concanavalina A. Mientras que en el grupo IS se observó una disminución de la proliferación T con respecto al Control, el grupo IS+ATRA fue capaz de revertir este efecto. También el grupo IS+ATRA registró un aumento del número de Li de ganglio CD19+,CD8+,CD4+ medido por citometría de flujo respecto al grupo IS. La administración paralela de ATRA no logró disminuir la población MDSC aumentada en el grupo IS respecto al Control. Sin embargo, la actividad de las MDSC se encontró disminuida en el grupo IS+ATRA presentando una menor producción de ON y actividad de Arg1 respecto al grupo IS ($p<0,05$). En conclusión, nuestros resultados indican que la administración de el ATRA a los ratones IS reestablece parámetros de la respuesta de la inmunidad adaptativa, como por ejemplo la generación de anticuerpos y la proliferación de células T, modulando el número de linfocitos y disminuyendo mediadores de inhibidores de MDSC. El ATRA mejora el estado inmunológico en la inmunosupresión derivada de LPS.

ABSTRACT

Immunosuppression resulting from septic processes is associated with decreased proliferation of T lymphocytes (Ly). In turn, immature myeloid suppressor cells (MDSC, Gr-1+ CD11b+) are involved in this process by the production of nitric oxide (NO) and the activation of Arginase 1 (Arg1). All-*Trans*-Retinoic Acid (ATRA) is an immunomodulatory drug and has effects on different cell populations, often modulating their survival. The overall objective of this project was to determine the effects of ATRA on MDSC as a strategy for reversing the LPS-mediated immunosuppression. We worked with a mouse model using increasing doses of LPS ip (5-100 ug/day/mouse) for 20 days in parallel with ATRA (500 ug/day/mouse) (IS+ATRA group) or Vaseline (vehicle) (group IS) orally. The control group was given saline i.p. (Control group) or ATRA alone orally (ATRA group). T cell proliferation was determined in cultures of lymph node cells in response to concanavalin A. While the IS group showed a decrease in T cell proliferation compared to Control, in the IS+ATRA group this effect was reversed. Moreover, the IS+ATRA group showed an increase in the number of Ly in lymph nodes (CD19+, CD8+, CD4+) as measured by flow cytometry compared to IS mice. Administration of ATRA failed to reduce the population of MDSC that was increased in the IS group. However, the activity of MDSC in T cell proliferation cultures was decreased in the group IS+ATRA, showing a smaller production of NO and Arg1 activity compared to the IS group. In conclusion, our results indicate that ATRA administration to IS mice restored parameters of the adaptive immune response such as antibody generation and T cell proliferation, by modulating the number of Ly and reduced the inhibitory mediators produced by MDSC. Therefore, ATRA improves the immunological state in LPS-derived immunosuppression.

ASOCIACIÓN ENTRE FACTORES GENÉTICOS Y EL RIESGO DE DESARROLLAR SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH) EN PACIENTES PEDIÁTRICOS LUEGO DE UNA INFECCIÓN CON ESCHERICHIA COLI PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA (STX). DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL GEN DEL RECEPTOR DE FRACTALQUINA (CX3CR1)."

Titular: Lic. Cecilia Analía Panek.

Colaboradores: Dr. Gustavo Gabriel Cabrera y Lic. María Pilar Mejías

Academia Nacional de Medicina, Instituto de Medicina Experimental

(IMEX-CONICET) - Buenos Aires – Argentina.

INTRODUCCIÓN

El SUH es una enfermedad que afecta principalmente a lactantes y niños en la primera infancia, y se caracteriza por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y daño renal agudo. En Argentina, esta enfermedad es endémica y constituye la primer causa de insuficiencia renal aguda, la segunda de insuficiencia renal crónica, y es responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes (Arch Latin Nefr Ped, 2001; 1:35-56). Su forma típica o post-diarrea se desarrolla secundariamente a la infección con cepas de *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) productoras de toxina Shiga (STEC) en el 15% de los niños infectados (Clin Microbiol Rev, 1989; 2:15). Distintas evidencias muestran que la respuesta inflamatoria durante la evolución de la infección juega un rol clave en el desarrollo del SUH (Clin Exp Immunol, 1999; 116(3):462-7).

La fractalquina (CX CL1) es una quimioquina que puede expresarse en forma soluble o anclada a membrana, actuando como molécula de adhesión, (*Nature*, 1997; 385:640) y sería responsable en parte de la infiltración de los monocitos durante los procesos inflamatorios en riñón (*Kidney Int*, 2002; 62:488). La expresión de CX CL1 es inducible en endotelio y epitelio por estimulación con citoquinas inflamatorias como TNF- α y LPS. (J Leukoc Biol, 1999; 66:937). El receptor para fractalquina, CX CR1, se expresa en células natural killer (NK), monocitos y un subset de linfocitos T (*Cell*, 1997; 91:521).

Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que los pacientes con SUH agudo presentan bajo porcentaje de células CX CR + (Monocitos y Natu-

ral Killer) en sangre periférica y que dicho porcentaje correlaciona en forma negativa con el grado de severidad del SUH, y con la presencia de células CX CR + en biopsias renales (Blood, 2007; 109:2438-45). Estas observaciones sugieren que durante el desarrollo del SUH, podría existir un reclutamiento específico de células CX CR + por fractalquina.

Por otra parte, han sido identificados dos polimorfismos debidos a mutaciones puntuales (*single nucleotide polymorphism* o SNP) en el marco de lectura abierto del gen que codifica CX CR. Estas mutaciones en las posiciones 839 CàT y 745 GàA causan cambios en la secuencia aminoacídica de CX CR (T280M y V249I, respectivamente) y conducen a una disminución de la afinidad del receptor por su ligando, afectando su función. Estudios realizados por otros grupos han asociado a estos polimorfismos con el riesgo de desarrollo y progresión de varias enfermedades. Por ejemplo, los pacientes homocigotas para el genotipo I249 tienen una más rápida progresión a SIDA, posiblemente debido a que se ve comprometido el rol de este receptor en dirigir las células inflamatorias a los sitios de infección, mientras que los pacientes con haplotipo V249-T280 muestran una menor progresión (J Infect Dis, 2005, 191:1971-80). En otro estudio, el genotipo VI-249 fue asociado a una reducción de riesgo a sufrir eventos coronarios (Blood, 2001, 97: 1925-28). En este caso, el efecto protector de I249 es mediado a través de un reducido reclutamiento de células inflamatorias al sitio dañado (Scand J Clin Lab Invest. 2008; 68(4):286-91).

Por todo esto, decidimos estudiar los polimorfismos en tres grupos de niños: Controles sanos, pacientes con infecciones STEC autolimitadas (I-STEC) y pacientes que han evolucionado a SUH, con el fin de determinar la existencia de asociación entre un polimorfismo determinado del gen CX CR y el riesgo de evolucionar a la complicación sistémica SUH.

RESULTADOS

Se determinaron los polimorfismos descriptos para el receptor CX CR en 132 Controles Pediátricos Sanos, 87 Pacientes SUH y 14 Pacientes I-STEC. Sus muestras de ADN fueron obtenidas a partir de orina y a continuación, los SNP se determinaron mediante la técnica de PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms). La misma consistió en amplificar por PCR un fragmento de 588 pb que contenía los dos sitios polimórficos descriptos, digerir los amplicones con las enzimas BsmBI y Psp1406 (Blood, 2001.

97: 1925-1928) y por último, analizar los distintos patrones de fragmentos de restricción (Figura 1).

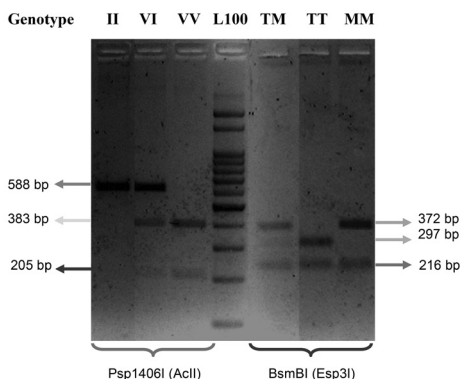


Figura 1: PCR-RFLP representativo (Gel de agarosa 2,5%)

Una vez obtenidos los genotipos, se analizaron las frecuencias de los polimorfismos por separado (VV, VI, II o TT, TM, MM), de los genotipos combinados (VV-TT, VI-TT, VI-TM, II-TT, II-TM y II-MM), y los haplotipos (V249T280, I249T280 y I249M280). En las diferentes tablas se muestran el número de individuos y los porcentajes. Todos los análisis se basaron en la determinación de los Odd Ratios (ORs) respecto al genotipo normal (VV-TT), como una medida asociación entre los genotipos CXCR y el SUH. La significancia de las asociaciones se evaluó con el test χ .

Para comenzar, se analizaron las frecuencias de portación de cada mutación, comparados con el genotipo normal (Tabla 1). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes SUH y los Controles sanos. Los ORs no ajustados, asociados a I248 (genotipos VI+II vs. VV) y M280 (genotipos TM+MM vs. TT) fueron 0,82 (CI 95%, 0,48-1,42, $p=0,49$) y 1,04 (IC95%, 0,57-1,89, $p=1$), respectivamente. Luego, se analizaron las frecuencias de los genotipos mutados en su forma homocigota y heterocigota, respecto al genotipo normal. Se observó que el genotipo VI fue menos frecuente entre los pacientes SUH comparados con los Controles sanos (27,5% vs. 35,5%), mientras que el genotipo homocigota II fue más frecuente (14% vs. 10,5%). Sin embargo, ninguna de estas diferencias fue estadísticamente significativa.

Tabla 1: Distribución de los genotipos en las poblaciones analizadas

Polimorfismo	Genotipo	Controles sanos (n=132)	Pacientes SUH (n=87)	Pacientes I-STEC (n=14)	odd ratios	p	CI 95%
V249I	VV	71 (54%)	51 (58,5%)	12 (86%)	1	-	-
	VI	47 (35,5%)	24 (27,5%)	2 (14%)	0,71	0,29	0,39-1,3
	II	14 (10,5%)	12 (14%)	-	1,19	0,83	0,51-2,8
	Portadores I	61 (46%)	36 (41,5%)	2 (14%)	0,82	0,49	0,48-1,42
	Frecuencia I	0,28	0,28	0,08			
T280M	TT	95 (72%)	62 (71%)	13 (93%)	1	-	-
	TM	31 (23,5%)	21 (24%)	1 (7%)	1,04	1	0,55-1,97
	MM	6 (4,5%)	4 (5%)	-	1,02	1	0,28-3,77
	Portadores M	37 (28%)	25 (29%)	1 (7%)	1,04	1	0,57-1,89
	Frecuencia M	0,16	0,17	0,04			

A continuación, se estudiaron las frecuencias de los genotipos combinados. Se encontró que las mismas fueron similares entre los Pacientes SUH y Controles sanos en casi todos los genotipos posibles, excepto en el genotipo VI-TT. Sin embargo, aunque este genotipo fue menos frecuente entre los pacientes SUH, en comparación con los Controles sanos (9% vs. 18%), estas diferencias no resultaron ser estadísticamente significativas ($p=0,1$).

Tabla 2: Distribución de los genotipos combinados en las poblaciones analizadas

Genotipo combinado	Controles sanos (n=132)	Pacientes SUH (n=87)	Pacientes I-STEC (n=14)	odd ratio	P	IC 95%
VV-TT	71 (54%)	51 (59%)	12 (86%)	1	-	-
VI-TT	24 (18%)	8 (9%)	1 (7%)	0,46	0,1	0,19-1,12
VI-TM	23 (17,5%)	16 (18%)	1 (7%)	0,97	1	0,47-2,01
II-MM	6 (4,5%)	4 (5%)	-	-	-	-
II-TT	-	3 (3%)	-	-	-	-
II-TM	8 (6%)	5 (6%)	-	-	-	-

Tres de los seis genotipos combinados no fueron evaluados debido al pequeño número de individuos con esos genotipos.

Por último, se analizaron las frecuencias de los haplotipos en los grupos estudiados (Tabla 3). No se encontraron diferencias en las frecuencias de los tres haplotipos entre los Pacientes SUH y Controles sanos.

Tabla 3: Frecuencias de los haplotipos en las poblaciones analizadas

Haplotipo	Controles sanos (n=132)	Pacientes SUH (n=87)	Pacientes I-STEC (n=14)
V249-T280	185 (71%)	126 (72%)	26 (93%)
I249-T280	32 (12%)	19 (11%)	1 (3,5%)
I249-M280	43 (17%)	29 (17%)	1 (3,5%)

Respecto a los pacientes I-STEC, aún no se pudieron realizar comparaciones debido al pequeño número de muestras analizadas.

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN:

Este es el primer estudio en caracterizar los polimorfismos del gen CXCR en la población argentina y en pacientes SUH.

Las frecuencias de los genotipos o haplotipos entre los pacientes SUH y Controles sanos fueron similares. Aunque se observó una menor frecuencia del genotipo VI-TT en los pacientes con SUH, no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre dicho polimorfismo y el desarrollo de SUH en niños argentinos. Sin embargo, esta diferencia se podría incrementar aumentando el número de individuos analizados.

Actualmente el SUH no tiene tratamiento específico, y el grado de lesión renal durante la fase aguda define la evolución a mediano-largo plazo. Esto hace que el 30 % de los niños sufra insuficiencia renal crónica llegando incluso a una insuficiencia terminal, requiriendo como única alternativa el trasplante. Por este motivo, sería muy interesante la búsqueda de marcadores que permitan predecir entre los infectados con STEC, aquellos con alto riesgo de evolucionar a SUH. Mucho se está trabajando en la búsqueda de una terapia específica que permita controlar el nivel de daño renal, y hasta el momento lo que sí es seguro es que dicha terapia deberá aplicarse antes del diagnóstico clínico de SUH. Debido a que solo un 15% de niños desarrolla el SUH, es importante contar con predictores de mala evolución, que permitan tratar sólo a aquellos niños con alta probabilidad de evolucionar a SUH.

RESUMEN

La forma típica del síndrome urémico hemolítico (SUH) se caracteriza por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y daño renal agudo. Es una complicación sistémica que se desarrolla en el 10-15% de los niños infectados con cepas enterohemorrágicas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC). Distintas evidencias sostienen que para la patogénesis del SUH, no sólo se requiere la interacción de la toxina Shiga (Stx) con su receptor específico en la células endoteliales y epiteliales renales, sino que la respuesta inflamatoria del huésped juega un papel decisivo en dicha evolución.

La fractalquina (CX CL) es una quimioquina transmembrana que se expresa en células endoteliales y epiteliales activadas, y ha sido implicada en diversos procesos patológicos, debido a que puede promover la migración y adhesión de poblaciones celulares que expresan su receptor específico (CX CR) hacia dicho tejido. Nosotros hemos reportado que los pacientes con SUH presentan bajo porcentaje de células CX CR+ (Monocitos y NK) en sangre periférica, correlacionándose en forma negativa con la severidad del SUH, y la presencia de células CX CR+ en biopsias de pacientes. Por otro lado, se han identificado dos polimorfismos (V249I y T280M) en el marco de lectura abierto del gen CX CR, que afectan la expresión y función del receptor. Algunos polimorfismos han sido asociados con menor riesgo en el desarrollo de enfermedades vasculares. Por todo esto, el objetivo de nuestro trabajo fue determinar si alguno de los polimorfismos del CX CR se asocia con un menor riesgo de desarrollar SUH. Luego de analizar los polimorfismos en 132 controles sanos y 87 pacientes SUH, no hemos encontrado diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas o haplotipos. Por lo tanto, los polimorfismos de CX CR no constituirían un factor de riesgo genético en el desarrollo de SUH en los pacientes pediátricos.

ABSTRACT

Post-diarrhea Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) is a vascular disease characterized by nephropathy, thrombocytopenia, and hemolytic anemia. It is a life-threatening systemic complication that occurs in 10-15% of children infected with enterohemorrhagic Shiga-toxins (Stx) producing-bacteria (STEC). Although Stx induces damage on endothelial and epithelial cells,

clinical and experimental data suggest that host's inflammatory response to bacterial virulence factors plays a pivotal role in the pathogenesis of the disease.

Fractalkine (CX CL1) is a transmembrane chemokine expressed on epithelial and endothelial cells upon activation which was involved in pathologic processes by orchestrating the selective migration and adhesion of specific subsets of CX3CR1-expressing leukocyte to inflamed tissues. We have found that HUS patients present a significant decrease in circulating leukocytes expressing the receptor for fractalkine (CX3CR1) (monocytes and Natural killer cells), which correlated with poor prognosis. In addition, CX3CR1+ leukocytes were detected in renal biopsies of HUS patients.

Two single-nucleotide polymorphisms of the CX CR gene (T280M and V249I) affect fractalkine receptor expression and function. Some polymorphisms were linked to lower risk of atherosclerosis, acute coronary events, and coronary artery endothelial cell dysfunction. According to these data, we studied a plausible protective effect of CX3CR1 polymorphisms in inflammation-mediated vascular injury, that could allow some of the children carrying this haplotype escape from a complete form of HUS. After analyzing polymorphisms in 132 healthy controls and 87 HUS patients, we did not find significant differences in the haplotype or genotype frequencies. Therefore, we could not find a significant association between CX CR polymorphisms and HUS development in argentinean children.

INTERACCIÓN ENTRE LOS GENES DE LOS COMPLEJOS PROTECTOR Y NO PROTECTOR DE TELÓMEROS EN CÉLULAS DE MIELOMA MÚLTIPLE. CORRELACIÓN CON ACTIVIDAD DE TELOMERASA Y LONGITUD TELOMÉRICA

Julieta Panero, Flavia Stella, Graciela Maciel, Irma Slavutsky.
Laboratorio de Genética de Neoplasias Linfoides, Instituto de Medicina
Experimental, CONICET-Academia Nacional de Medicina.

RESUMEN

Las proteínas de unión a telómeros cumplen la función de proteger los extremos cromosómicos, siendo de gran importancia en la regulación de la longitud telomérica (LT). Las mismas se disponen en dos grandes complejos, protector y no protector de los telómeros. El objetivo del presente proyecto estuvo dirigido al estudio de la expresión de genes asociados a los complejos protector (*TIN2*, *POT1*, *TPP1* y *RAP1*) y no protector (*DKC1* y *RPA1*) de los telómeros en desórdenes a células plasmáticas, siendo nuestra hipótesis de trabajo que el acortamiento telomérico presente en las células de mieloma múltiple (MM), previamente descripto por nuestro grupo, estaría asociado a modificaciones en la expresión de los genes que regulan la LT. Se evaluaron 70 pacientes, 38 con MM y 32 con gammopatía monoclonal de significado incierto (MGUS). El análisis de expresión génica se llevó a cabo mediante la técnica de PCR en tiempo real (qRT-PCR), empleando la metodología Taq-Man. Asimismo, se determinó la relación entre la expresión de estos genes y la LT, medida por la técnica de *Terminal Restriction Fragments*. El análisis de los datos indicó una tendencia a mayores niveles de transcripto de todos los genes evaluados en pacientes con MM respecto de MGUS, evidenciándose diferencias significativas entre ambas entidades para la expresión de *POT1*, *TPP1* y *DKC1* ($p < 0,04$), sugiriéndose la participación de los mismos en el proceso de transformación de MGUS a MM. En simultáneo, se evaluó la interacción entre el nivel de expresión de los genes antes mencionados y la actividad de telomerasa, medida por la expresión de su subunidad catalítica *hTERT*. Los pacientes con MM presentaron niveles de *hTERT* significativamente mayores respecto de los casos con MGUS ($p = 0,01$), observándose además asociación positiva con los niveles de *DKC1* ($p = 0,008$), sustentando el rol de *DKC1* en el mantenimiento de la estabilidad del complejo de la telo-

merasa. Ambas entidades presentaron acortamiento telomérico significativo respecto de controles ($p < 0,002$). En MM, la expresión de *POT1* se encontró asociada positivamente con $\beta 2$ microglobulina y negativamente con los niveles de hemoglobina ($p < 0,03$). En conclusión, en este estudio se analizan por primera vez, a nuestro conocimiento, componentes del complejo protector y no protector de los telómeros en desórdenes a células plasmáticas, observándose una modificación global de los mismos con diferencias significativas entre MM y MGUS, sugiriendo su participación en el desarrollo y/o progresión de las patologías en estudio.

ABSTRACT

Telomere associated proteins play an essential role in chromosome ends protection and in telomere length (TL) regulation. They are organized in two mayor complexes: shelterin complex and non-shelterin complex. The aim of the present study was to evaluate the expression profile of shelterin genes (*TIN2*, *POT1*, *TPP1* and *RAP1*) and non-shelterin genes (*DKC1* and *RPA1*) in plasma cell disorders, being our hypothesis that the telomere shortening observed in myeloma cells, previously described by our group, might be associated to modifications in their expression levels. Bone marrow samples from 70 patients: 38 with MM and 32 with monoclonal gamopathy of undetermined significance (MGUS) were studied. Real-Time Quantitative PCR was used to quantify gene expression and TL measurements were performed by Terminal Restriction Fragments. Our findings showed a tendency to higher transcript levels of all genes in MM patients compared to MGUS, with significant differences for *POT1*, *TPP1* and *DKC1* ($p < 0.04$), suggesting their participation in the transformation process from MGUS to MM. In addition, *hTERT* (telomerase catalytic subunit) expression was evaluated. An up-regulation of *hTERT* in MM cases with respect to MGUS was observed, and a positive association with *DKC1* expression ($p = 0.008$) was also found, supporting *DKC1* role in telomerase complex stability. In MM, the analysis of clinical characteristics showed *POT1* mRNA levels positively associated to $\beta 2$ microglobuline and negatively correlated with hemoglobin levels ($p < 0.03$). To our knowledge, this is the first study showing a global modification in the expression of telomere-associated genes in plasma cell disorders, with significant differences between MM and MGUS, suggesting their participation in the development/ progression of these entities.

ESTUDIO DE FENOTIPOS CONDUCTUALES Y MECANISMOS CELULARES DESENCADENADOS POR LA NICOTINA EN MODELOS ANIMALES DE ADICCION

Bioq. Verónica Pastor; Lic. Ximena Kedikian

Laboratorio de Neurociencias; Dto. de Fisiología; Fac. de Medicina; UBA

RESUMEN

Basándonos en la respuesta locomotora inicial a una inyección aguda de un psicoestimulante, podemos clasificar a los animales en altos o bajos respondedores a la droga (HR o LR, respectivamente). Esta clasificación puede ser utilizada para predecir los efectos reforzantes o motivacionales de la droga en estudio. Para la cocaína, por ejemplo, ha sido demostrado que la respuesta locomotora a dicha droga predice el desarrollo de sus efectos reforzantes evaluados mediante el condicionamiento de preferencia por el lugar (CPP); siendo los LR a la cocaína más propensos a mostrar una preferencia por el lugar asociado a la droga respecto de los HR. Nuestro objetivo fue explorar si la administración de una dosis aguda de nicotina, para clasificar a los animales en altos y bajos respondedores a dicha droga de abuso, podía predecir el desarrollo del CPP inducido por dicha droga en ratas macho adolescentes, de la cepa Sprague-Dawley; además de evaluar el efecto de la exposición previa a la droga sobre el CPP. Nuestros resultados mostraron que, en un CPP de siete sesiones de condicionamiento, sólo los LR mostraron una preferencia por el lugar asociado a la nicotina, lo que nos permite suponer que las ratas LR serían más susceptibles a los efectos reforzantes de la nicotina que los HR, como había sido reportado previamente para la cocaína.

A nivel bioquímico, decidimos a estudiar la expresión de algunos factores de transcripción que están íntimamente relacionados con los procesos adictivos. El factor de transcripción Nurr1, miembro de la familia NGFI-B de los receptores nucleares huérfanos, es altamente expresado en las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio de los roedores y es esencial para su desarrollo fenotípico y para su mantenimiento. Hay varias líneas de evidencia que indican que la nicotina produce efectos en el comportamiento a través

de sus acciones sobre el sistema dopaminérgico mesolímbico. Sin embargo, no se conoce aún si Nurr1 participa en los cambios conductuales inducidos por la nicotina. En este trabajo, medimos la expresión de Nurr1 en el área tegmental ventral (VTA) de animales clasificados como HR o LR, luego de evaluar la respuesta locomotora inicial a la nicotina. Nuestros resultados mostraron que en el VTA de ambos grupos, la expresión de Nurr1 disminuye en comparación con los controles. Además, en los LR, la expresión de Nurr1 en el VTA es menor que en los HR. Si bien son necesarios más estudios para completar nuestros hallazgos, estos resultados sugieren que el factor de transcripción Nurr1 en el VTA podría jugar un rol importante en la vulnerabilidad a los efectos inducidos por la nicotina.

Nuestros resultados, a su vez, enfatizan el hecho de que utilizar modelos animales basados en la respuesta locomotora diferencial a un psicoestimulante como la nicotina, puede resultar una estrategia útil a la hora de identificar factores genéticos y mecanismos celulares asociados a la vulnerabilidad para desarrollar conductas de tipo adictivas.

ABSTRACT

Based on the initial locomotor activity (LA) response to an acute drug administration, animals can be classified as low or high responders (LR or HR). It has been shown that LR to cocaine are more susceptible to develop cocaine place conditioning than HR. However, it is unknown if a preexposure to nicotine can predict rewarding effects of this drug. We designed the present study to determine if individual differences in initial locomotor responsiveness to nicotine have any predictive value on nicotine-induced conditioning place preference (CPP) using male Sprague-Dawley rats. We evaluated rats' locomotor response to a single injection of nicotine classified them in HR or LR based on whether their locomotor responses were above or below the median activity level of the subject sample. Then, we trained them in the CPP paradigm, in order to evaluate nicotine rewarding effects. Interestingly, in a seven-trial CPP, only LR group showed a positive CPP score indicating that LR rats may be more susceptible to nicotine rewarding effects than HR, as was previously described for cocaine.

The transcription factor Nurr1 is highly expressed in rodent midbrain dopamine neurons and is essential for their phenotypic development and maintenance. Nicotine produces behavioral effects via actions on the meso-

limbic dopamine system, but is still unknown whether Nurr1 participates in nicotine-induced behavioral changes. We measured Nurr1 protein expression in the ventral tegmental area (VTA) of HR and LR, following locomotor classification. Our results showed that in both groups, Nurr1 expression was decreased compared to controls. Furthermore, Nurr1 expression was lower in LR compared to HR. These preliminary findings suggest that Nurr1 expression in the VTA could be related to vulnerability to nicotine effects.

Our findings also emphasize the fact that using animal models based on differential individual responsiveness to drugs may be an effective strategy for identifying genes and cellular mechanisms that can contribute to vulnerability to drug addiction.

RELEVANCIA DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN MEDIADAS POR FGFR Y RECEPTORES HORMONALES EN EL CRECIMIENTO TUMORAL DE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA HUMANO METASTÁSICAS Y HORMONO RESPONDEDORAS.

Dra. Cecilia Pérez Piñero

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), Laboratorio de Carcinogénesis Hormonal

RESUMEN

Anteriormente demostramos que el FGF2 activa al receptor de progesterona (RP) aumentando la proliferación de células de cáncer de mama humano T47D y de modelos murinos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la relación entre FGFR2 y RUNX2 en la línea tumoral mamaria humana IBH-6. Estas células son capaces de crecer como xenotransplantes sin la administración de hormonas exógenas a pesar de expresar receptores de progesterona (RP) y de estrógeno alfa (RE α), lo cual nos estaría dando la pauta que otras vías proliferativas son más importantes que las del RE y RP. En este proyecto postulamos al FGFR2 como un posible mediador de este efecto y mediante el bloqueo de su expresión a nivel proteico (IBH-6 shFGFR2) corroboramos su importancia para el crecimiento y establecimiento de tumores en experimentos *in vivo*. Los tumores generados por las células IBH-6 shFGFR2 presentaron una menor tasa de división celular y una histología completamente diferente a los tumores control, con la cromatina empaquetada, las células ordenadas en fascículos y como único indicio de malignidad la invasión del tejido muscular adyacente. Además, al estudiar varias vías de señalización por *Western Blot* observamos una disminución en la activación de las mismas en comparación con los tumores control (AKT y ERK). Luego, quisimos profundizar el estudio de la interacción entre FGFR2 y el factor de transcripción RUNX2. La expresión de RUNX2 aumenta en la transición a la hormono independencia. RUNX2 es un regulador de la expresión del FGFR2 y, por otro lado, FGF2 aumenta la expresión de RUNX2. Para lograr este objetivo, sobre-expresamos RUNX2 en las células con el FGFR2 silenciado (shFGFR2) con la hipótesis que RUNX2 sería capaz de revertir el fenotipo generado por el silenciamiento del FGFR2. Luego de la inoculación de las células en ratones inmunosupri-

midos, obtuvimos tumores con un alto índice de malignidad, gran número de mitosis, aéreas hemorrágicas y metástasis en sitios distantes al de inoculación de las células. La expresión del factor de transcripción RUNX2, además de revertir el fenotipo *in vivo* obtenido por el silenciamiento del FGFR2, les otorgó a las células la capacidad de ser metastásicas, ya que la línea IBH-6 *wild type* no genera metástasis cuando crece en xenotransplantes. Los resultados indican que el FGFR2 es una proteína clave involucrada en el crecimiento de tumores mamarios. El hecho que RUNX2 revierte el efecto inhibitorio inducido por shFGFR2, nos permite postular que las vías de señalización involucradas son independientes de FGFR2, suponiendo que FGF2 activa a FGFR2 y luego a RUNX2. Los resultados enfatizan el uso de inhibidores de FGFR2 en combinación con la terapia estándar en pacientes con cáncer de mama.

SUMMARY

FGFR2 is important for tumor growth in IBH-6 human breast cancer cell line. These cells express ER α and PR and FGFR 1 to 4. They are able to grow in mice without the administration of hormones. In these cells other proliferative pathways are more important than those of ER and PR. We hypothesize that the FGFR2 is a potential mediator of this effect and by blocking its expression (IBH-6 shFGFR2) we corroborated its importance for the growth and development of tumors. Tumors generated by shFGFR2 IBH-6 cells had a lower proliferation index and a different histology compared with control tumors. They present the chromatin packed, cells arranged in fascicles and the only sign of malignancy seen was the invasion of adjacent muscle tissue. Moreover, activation of ERK and AKT pathways were diminished. Then, we wanted to study the interaction between FGFR2 and the transcription factor RUNX2. RUNX2 was over-expressed in cells with silenced FGFR2 (IBH-6 shFGFR2) with the hypothesis that it will be able to reverse the phenotype generated by shFGFR2. In the *in vivo* experiments, we obtained tumors with a high degree of malignancy, large number of mitosis, high vascularization and metastases. The expression of the transcription factor RUNX2 reversed the phenotype obtained by silencing FGFR2 and gave to the cells the capability of being metastatic.

REFERENCIAS

1. C. Lanari et al., *Endocr.Relat Cancer* 16, 333-350 (2009).
2. S. Giulianelli et al., *Int J Cancer* 123, 2518-2531 (2008).
3. D. J. Hunter et al., *Nat.Genet.* 39, 870-874 (2007).
4. K. B. Meyer et al., *PLoS.Biol.* 6, e108 (2008).
5. N. Selvamurugan et al., *FEBS Lett.* 583, 1141-1146 (2009).
6. N. M. Teplyuk et al., *J Cell Biochem.* 107, 144-154 (2009).
7. S. Ogawa, M. Satake, K. Ikuta, *J Biochem.* 143, 695-709 (2008).
8. S. L. Grimm and J. M. Rosen, *J Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* 8, 191-204 (2003).
9. J.P. Cerliani et al, *Cancer Res.*, 71, 3720-3731 (2011).

ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO DE OBESIDAD MATERNA ADQUIRIDA POR DIETA PARA EL ESTUDIO DE DEFECTOS CARDÍACOS CONGÉNITOS EN LA PROGENIE

María Carolina Pustovrh, Evelin Elia, Sofía Ginenco, Pablo Marantz,
Dante Paz

Laboratorio del Desarrollo, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Unidad
de Cardiología Infantil del Hospital Italiano

INTRODUCCIÓN

La obesidad aumentó de manera alarmante en el mundo transformándose en la más importante de las enfermedades crónicas no transmisibles. A nivel mundial, se estima que 1.6 millones de adultos presentan sobrepeso (índice de masa corporal (IMC) comprendido entre 25 y 29 kg/m²) y 400 millones de personas son obesas (IMC $\geq$ 30) .

A finales del 2013 la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), informó que Argentina se encuentra en tercer lugar en el continente en incremento de obesidad, siendo la misma de un 29 % en la población adulta y 7 % en la población infantil (<http://www.fao.org>).

La obesidad, en particular la abdominal, se asocia con riesgos aumentados para diferentes enfermedades . En el embarazo la obesidad incrementa el riesgo materno promoviendo la ocurrencia de parto pretérmino, parto instrumentado, morbilidad perioperatoria, trastornos hipertensivos, preeclampsia, tromboembolismo venoso, diabetes gestacional, disminución de las tasas de iniciación o continuación de la lactancia materna, riesgos con la anestesia perioperatoria . También están descritos riesgos propios para el feto como: mayor probabilidad de muerte intrauterina, macrosomía, restricción del crecimiento intrauterino, anomalías congénitas y neonatales . Todos estos riesgos incrementan en relación directa con la severidad de la obesidad, siendo incluso significativos en mujeres que presentan solamente exceso de peso .

Las anomalías congénitas son la principal causa de muerte fetal y de mortalidad infantil. En los últimos años se ha demostrado que la obesidad materna está asociada con el incremento de defectos en la formación del tubo neural, el corazón y los grandes vasos, espina bífida y onfalocelo . Específicamente a nivel cardíaco las anomalías que se describen, con diversos

grados de asociación a la obesidad materna, son: alteraciones en la separación auricular y ventricular, transposición de grandes vasos, defectos en el tronco arterioso y en las almohadillas endocárdicas (precursores de las válvulas cardíacas), aumento de la incidencia de tetralogía de Fallot

Los modelos animales de obesidad son indispensables a la hora de evaluar el impacto de esta patología sobre el desarrollo embrionario. La obesidad inducida por dieta de cafetería es posiblemente el modelo que más se asemeja a la realidad de la obesidad humana. Esta dieta consiste en ofrecer a los animales alimentos altamente palatables, ricos energéticamente y poco saludables.

Con base en estos antecedentes el objetivo de este trabajo fue establecer un modelo de obesidad materna adquirida por dieta para el posterior estudio de esta patología sobre el desarrollo cardíaco embrionario fetal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

24 ratas Wistar hembras de 21-23 días de edad fueron adquiridas y mantenidas en el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones de luz-oscuridad (14-10 hs) y temperatura controlada (22-23 °C). Todos los protocolos utilizados fueron realizados de acuerdo con las normativas de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación aprobadas por el Comité Institucional (CICUAL-FCEyN-UBA).

Establecimiento del modelo de obesidad materna

Luego del destete las ratas fueron divididas en tres grupos: 1) Grupo control dieta estándar (DE; n= 8), fue alimentado con pellet Purina Rat Chow, valor energético: 3.3 Kilocalorías/g; composición: 11.4% de grasas, 71.4% de carbohidratos, 17.2% de proteínas. 2) Grupo experimental dieta de cafetería (DC; n= 8), fue alimentado con una dieta hipercalórica compuesta por un pellet realizado con galletitas de chocolate molidas, maní salado, leche condensada, manteca, harina de soja y aglutinante. 3) Grupo experimental dieta de cafetería con incentivo (DCI; n= 8), fue alimentado con una dieta hipercalórica con rotación de los alimentos ofrecidos cada dos días. La comida fue dispuesta en forma directa sin formar un pellet. El incentivo consistió en galletitas de chocolate, maní, salchichas, queso y papas fritas.

En ambos grupos experimentales la comida fue ofrecida en exceso con peso controlado y el agua suplantada con vitaminas (1g/5L, Vigorex Fuerte) fue administrada *ad libitum*.

Administración del alimento y control del desecho

Para realizar los cálculos de consumo, el alimento fue pesado previo a depositarlo en los comederos de las jaulas (Alimento inicial, A), a la mañana siguiente se pesó el excedente de alimento que quedó en el comedero (Alimento final, A) y el alimento que se encontró en el piso de la jaula (desperdicio, D). Estos pesos fueron monitoreados diariamente. Los cálculos de ingesta se realizaron de la siguiente manera: $A - (A + D)$.

Valoración del estado metabólico

Al inicio de la alimentación se tomó una muestra de sangre de las venas radiales de la cola de los 24 animales para obtener los valores iniciales de glucemia, colesterol y triglicéridos. Esta toma se repitió a cada grupo luego de los 50 días de alimentación. Los niveles de glucemia, colesterol y triglicéridos fueron determinados utilizando métodos enzimáticos (Laboratorios Wiener).

Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como media $\pm$ error estándar. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPAD software, San Diego, CA, USA) considerando significativo un valor de $P < 0.05$.

Para el análisis estadístico de los pesos diarios se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas. Para los análisis restantes se aplicó el test de ANOVA de un factor seguido del test de Tukey.

RESULTADOS

Establecimiento del modelo de obesidad materna

El peso inicial de los animales fue controlado antes de la administración de las dietas. Estos pesos no presentaron diferencias entre los animales designados al azar en los tres grupos experimentales, DE: $124,0 \pm 4,0$ g; DC: $126,8 \pm 8,1$; DCI: $124,0 \pm 4,0$. Figura 1.

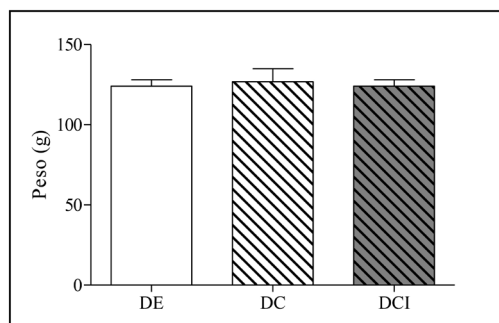


Figura 1: Peso inicial. DE: dieta estándar (n=8), DC: dieta cafetería (n=8), DCI: dieta cafetería con incentivo (n=8). Los datos representan la media $\pm$ EE.

Análisis bromatológico de las dietas de experimentación

El análisis bromatológico del pellet del grupo DC fue realizado por en el Departamento de Bromatología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA. Las características nutricionales de la dieta fueron las siguientes: Humedad 5.9%, Cenizas 1.7%, Lípidos 42%, Proteínas 13.25% e Hidratos de Carbono 37.14%. El valor energético: 580 Kilocalorías/100g.

Las características bromatológicas de la dieta DCI fue calculada con la información nutricional proveniente del fabricante. Lípidos: 42,87 %, Proteínas: 30,33 %, Hidratos de carbono: 26,8 %. El valor energético: 435 Kilocalorías/100g.

Análisis del consumo de alimento

Los consumos iniciales fueron equivalentes en las tres dietas, pero luego de la semana 6 el consumo de alimento se incrementó de manera significativa en las dietas experimentales respecto a DE. A la semana 7 DC y DCI presentaron un incremento del 110 % en el consumo vs DE ($p < 0,001$), en la semana 8 la dieta DC presentó un incremento del 73 % ($p < 0,001$) y la dieta DCI 140 % ($p < 0,001$). En la últimas semana los animales consumieron aproximadamente un 40 % más de la dieta DCI con respecto a la dieta DC ($P < 0,001$). Figura 2

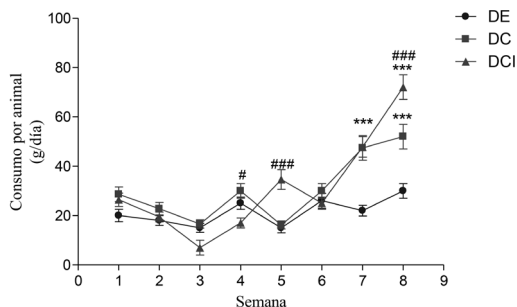


Figura 2: Consumo de alimento semanal. Dieta estándar (DE), dieta cafetería (DC), dieta cafetería con incentivo (DCI). Los datos se expresan como la media del consumo por animal (gramos/día) $\pm$ EE. *** $p < 0,001$ vs DE. $p < 0,05$ y $p < 0,001$ vs DC.

El análisis del consumo calórico fue calculado para la semana inicial (semana 1) y final de experimentación (semana 8). Los resultados mostraron que en la semana 1 los animales sometidos a la dieta DC presentaron un mayor consumo calórico que DCI vs DE ($p < 0,05$). En la semana 8, todos los grupos habían incrementado su consumo de calorías respecto al inicial siendo este aumento significativo para los grupos DC ($p < 0,02$) y DCI ($p < 0,01$) comparado con sus valores en la semana 1. Además, la ingesta calórica aumentó un 235 % en el grupo DC ($p < 0,01$) y 280 % en el grupo DCI ($p < 0,01$) vs DE. Figura 3

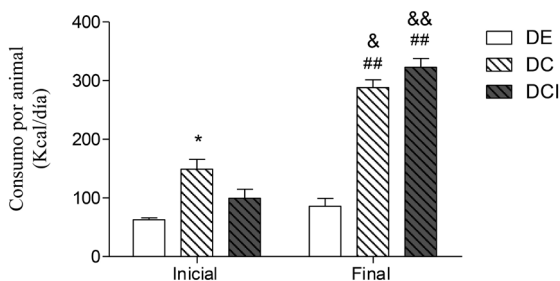


Figura 3: Ingesta calórica semanal. Dieta estándar (DE), dieta cafetería (DC), dieta cafetería con incentivo (DCI). Los datos se expresan como la media del consumo por animal (Kcal/día) $\pm$ EE. * $p < 0,05$ vs DE inicial. $p < 0,02$ y $p < 0,01$ vs sus respectivos valores iniciales. $p < 0,01$ v DE final.

Ganancia de peso

El consumo de alimento a lo largo de las semanas de experimentación se vio reflejado en un aumento del peso corporal de los animales. En el caso de las dietas hipercalóricas de cafetería solamente la dieta DCI presentó un incremento significativo del 22 % del peso de los animales en comparación al grupo DE ($p < 0,05$). Figura 4

Los animales alimentados con la dieta DCI presentaron un aumento tanto del tamaño corporal como del tejido adiposo. De manera interesante, aunque el grupo DC no presentó cambios en el peso en comparación al DE, si fue evidente la presencia de mayor tejido graso.

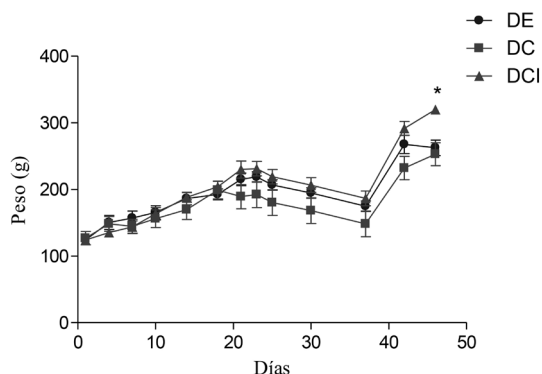


Figura 4: Ganancia de peso. Dieta estándar (DE), dieta cafetería (DC), dieta cafetería con incentivo (DCI). Los datos se expresan como la media del peso (g) $\pm$ EE. * $p < 0,05$ vs DE.

Evaluación de los parámetros metabólicos

Las ratas alimentadas con las dietas DC y DCI presentaron valores de glucemia elevados comparados con las ratas DE ($p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente).

Los valores de colesterol, si bien mostraron una tendencia al aumento en los grupos alimentados con las dietas de cafetería, no fue significativo. Aunque el grupo DCI presenta valores de colesterol mayor a los valores de referencia para la cepa.

Los valores de triglicéridos se mantuvieron dentro de los parámetros normales en los tres grupos dietarios estudiados. Tabla 1

Tabla 1: Perfil metabólico

Grupo	Parámetros metabólicos		
	Glucemia (mg/dL)	Colesterol (g/L)	Triglicéridos (mg/dL)
Valores iniciales	189.7 $\pm$ 4.8	0,85 $\pm$ 0,05	62.4 $\pm$ 2,5
DE	191,5 $\pm$ 5,7	0,87 $\pm$ 0,05	70,4 $\pm$ 5,2
DC	263,8 $\pm$ 2,9 **	1,02 $\pm$ 0,13	48,5 $\pm$ 10,1
DCI	324,7 $\pm$ 14,1 ***	1,20 $\pm$ 8,9	60,2 $\pm$ 8,9

Dieta estándar (DE), dieta cafetería (DC), dieta cafetería con incentivo (DCI)

DISCUSIÓN

Conocer los efectos de la obesidad materna sobre el desarrollo embrionario-fetal es uno de los retos actuales en la investigación básico-clínica. En este sentido la obesidad inducida por dieta de cafetería es uno de los modelos más simple y posiblemente el que más se asemeja a la realidad de la obesidad humana.

Esta dieta se caracteriza por brindar a los animales un acceso libre a una variedad de alimentos altamente palatables y ricos energéticamente. En este biomodelo de obesidad, la ganancia de peso resulta ser considerablemente mayor en comparación a la obtenida con las tradicionales dietas ricas en grasas.

En este estudio, se trató de establecer un modelo de obesidad materna adquirida por dieta de cafetería usando dos variables: la administración en forma de pellet y la administración de alimentos tipo snacks de consumo humano. Ambos tipos de administración de dieta de cafetería ya fueron probados por otros investigadores a nivel mundial mostrando resultados dispares.

En este estudio hemos podido observar que los animales sometidos a dieta de cafetería a los que se le ofrecía un alimento nuevo de manera periódica, mantenían un alto grado de exploración del medioambiente, que resultó

en una inducción de la hiperfagia y el consecuente aumento de peso corporal. Estos resultados, están de acuerdo a otros estudios que muestran un aumento en la ansiedad de los animales.

Sin embargo, cuando la dieta fue administrada a través de la formación de pellets, dada la composición hipercalórica de los mismos, se produjo un rápido incremento del consumo calórico, pero este no se tradujo en un incremento en el peso de los animales.

El perfil metabólico determino que ambos grupos alimentados por dieta de cafetería presentaron niveles séricos elevados de glucosa, siendo mayor en el grupo DCI, en el cual también se mostró una tendencia al aumento del colesterol. Ha sido ampliamente documentado que la obesidad frecuentemente transcurre con una disminución de la capacidad de la insulina en la regulación del metabolismo de la glucosa en los tejidos periféricos. En este sentido estudios previos han descrito un desequilibrio en la homeostasis de la glucosa e insulina como consecuencia de la dieta de cafetería. Sin embargo, los valores elevados de colesterol son más representativos en machos alimentados bajo este tipo de dieta que en hembras.

Este trabajo nos permitió determinar que la dieta de cafetería con recambio diario de alimentos altamente palatables de consumo humano, permite establecer un modelo de obesidad adquirida por dieta en las ratas Wistar, generando hiperfagia voluntaria y aumento de peso excesivo en el animal.

ABSTRACT

Obesity has reached epidemic proportions worldwide and it affects mainly adolescents and women of reproductive age. The maternal overnutrition is an important factor that could be lead to heart defects in the developing embryo.

The aim of this study was to establish an animal model of maternal obesity to be employed in future studies on effects of this pathology over heart development.

Experimental design: 24 Wistar rats (21-23 day old) were divided into three groups and were fed for 50 days: 1) Standard diet group (DE, n = 8) was fed with Purina Rat Chow. 2) Cafeteria diet group (DC, n = 8) was fed with a pellet made with chocolate cookies, salty peanut, condensed milk, butter and soy flour. 3) Cafeteria diet with incentive (DCI, n = 8) was fed with snacks as: chocolate cookies, salty peanut, sausages, potato chips and cheese.

The amount of food consumed, calories intake, body weight gain, and biochemistry parameters were evaluated.

Results: At the end of diet administration, the food intake was increased 73 % for DC group ($p<0.001$) and 140 % for DCI group ($p<0.001$) compared with DE. Body weight was increased 22 % in DCI animals respect to DE and DC groups ($p<0.05$). Both cafeteria diet groups showed a significant increases in the glucose value compared with DE group ($p<0.01$ y $p<0.001$, respectively). And cholesterol value was increased in the DCI rats compared with DE.

Conclusion: Cafeteria diet with incentive produces an increase of voluntary hyperphagia and excessive weight gain in female Wistar rats. It is proper diet to establish a maternal obesity model for the study of heart development.

SINAPSIS VIROLÓGICA MACRÓFAGO-GLIA COMO EVENTO DISPARADOR DEL ENVEJECIMIENTO CELULAR Y LA NEURODEGENERACIÓN PRECOZ INDUCIDA POR LA INFECCIÓN POR HIV

Ojeda Diego, Berría María Isabel, Quarleri Jorge

Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y Sida, Facultad de Medicina,
Universidad de Buenos Aires; CONICET.

INTRODUCCIÓN

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH - 1) invade el sistema nervioso central (SNC). Desde los primeros años de la epidemia del VIH / SIDA , las condiciones neuropatológicas observadas en individuos infectados durante las últimas etapas de la enfermedad se atribuyeron al efecto de la infección viral del cerebro (Eugenin et al . 2011 , Gras y Kaul 2010, Williams et al . 2012) . Síndromes neurológicos asociados con el VIH fueron luego definidos como trastornos neurocognitivos asociados (HAND), y tres categorías fueron reconocidos de acuerdo con las pruebas neuropsicológicas : la demencia asociada al VIH (HAD), trastorno neurocognitivo leve y deterioro neurocognitivo asintomático (Antinori et al., 2007) . Dado que los síntomas HAND están estrechamente asociadas con el daño y la pérdida de neuronas , mientras que este tipo celular no puede estar infectada por el VIH , otros mecanismos neuropatógeno lugar de la infección directa deben participar (González - Scarano y Martín -García 2005 , Kaul et al. 2005 , Spudich y González Scarano 2012). Aunque los mecanismos que conducen a la muerte neuronal aún están en discusión, la principal función de los macrófagos y microglia está bien establecida (González - Scarano y Martín -García 2005, Gorry et al. 2003). Aunque la infección restrictiva de los astrocitos no es capaz de soportar la infección por VIH en curso en el cerebro, tales células gliales contribuirían a HAND a través de mecanismos de astrogliosis inducidos por quimiocinas proinflamatorias y citoquinas locales. Tal astrocitosis , caracterizado por aumento de la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), es un sello distintivo reconocido de la infección por VIH de SNC (Bell et al . 2006, Zhou et al . 2004 , Zou et al . 2007). Sin embargo, un vínculo directo entre la activación de astrocitos y la muerte de neuronas sigue en estudio.

Curiosamente, los astrocitos se someten a un deterioro funcional con la edad en vivo que es paralelo a la disminución funcionales in vitro, que muestran un proceso de telómero - envejecimiento (Bhat et al. 2012, Pertusa et al. 2007).

La infección por VIH puede afectar a la duración de la vida celular afectando a la longitud de los telómeros y la actividad de la telomerasa . Esta enzima es una transcriptasa inversa que añade TTAGGG repite a los telómeros y por lo tanto mantiene la longitud de los telómeros y evita la senescencia celular (Nandakumar y Cech 2013). Nosotros y otros hemos informado que la infección por VIH afecta negativamente a la actividad telomerasa (TA) en las células CD4 + y linfocitos T CD8 + (Ballon et al . 2001, Franzese et al . 2007 , Reynoso et al . 2010), pero aumenta en los macrófagos (Reynoso et al . 2012). Durante el desarrollo del SNC, la actividad de la telomerasa es alta en las células progenitoras neurales pero luego disminuye a medida que se produce la diferenciación (Fu et al. 2000). Dado que la actividad de la telomerasa y la longitud de los telómeros están estrechamente relacionados con la resistencia de las células al estrés y lesiones, analizamos su variación durante la activación de astrocitos mediada por VIH.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento y cultivo de astrocitos primarios murinos

Cultivos celulares astrogiales se obtuvieron de los cerebros de los ratones Balb / c recién nacidos como se describió previamente (Berria y Lascano 1985, Borda et al. 2004), y siguiendo los protocolos de los animales que han sido aprobados por el comité institucional de la experimentación con animales. Brevemente, hemisferios corticales fueron cosechadas y tejidos neurales digeridos por 0,25 % de tripsina. Frascos (75 cm²) fueron sembradas con 1x10⁶ células / ml de medio de crecimiento (DMEM suplementado con 20 % de suero fetal bovino, glutamina , y antibióticos) dos veces durante 1 h con el fin de eliminar la contaminación de fibroblastos . Al cambiar el sobrenadante dentro de las 24 h, las neuronas fueron eliminados por medios de unión diferencial, dejando una población casi homogénea de células gliales. Después de 3 semanas a 37°C, el cultivo de células primarias ya confluentes se agitó una vez durante 2 horas a 37°C , y el sobrenadante se descartó el fin de separar los oligodendrocitos contaminantes que crecen en la parte superior de la monocapa de células adherente astrogial restante, que a su

vez se trataron con tripsina (Du et al . 2010) . Las células resultantes se resuspendieron (5×10^4 células/ml de medio de crecimiento) y se sembraron como primer subcultivo en placas de 24 pocillos con insertos de vidrio de 12 mm para inmunomarcaje y en frascos de 25 cm² para la proteína y la extracción de ADN. Posteriormente, la marcación con inmunoperoxidasa para GFAP mostró una población muy homogénea de astrocitos ($\geq 95\%$, datos no mostrados) . Después de 2 días de la siembra, se retiró el medio de crecimiento, y las monocapas de células fueron infectadas con el VIH/VSV - G en una multiplicidad de infección de 1. A los 1, 6, 8 y 13 días post- infección (pi) , 3-4 muestras fueron recolectadas para cada punto de tiempo experimental. Los sobrenadantes se congelaron de manera rutinaria a -20°C para la medición posterior de la producción de antígeno p24 de VIH. Las monocapas se fijaron con paraformaldehído al 2% más 0,1 % de Triton X - 100 a 37°C durante inmunomarcación , o con tripsina de la proteína y la extracción de ADN.

Generación del virus pseudotipado VIH-1/VSV-G; infección in vitro de astrocitos murinos

El VIH - 1 pseudotipado con la glicoproteína VSV-G se preparó mediante la transfección de células 293T. Brevemente, el VIH - 1 clon molecular utilizado fue NL4 - 3, que expresa todas las proteínas conocidas de VIH. El vector de expresión de VSV -G pL - VSV - G contiene un inserto de VSV - G en el vector de expresión pcDNA modificado mediante la sustitución del promotor de citomegalovirus con el VIH -1 en la repetición terminal larga. Stocks de virus de alta titulación fueron producidos en células 293T de riñón embrionario humano transfectadas con el ADN respectiva utilizando Lipofectamine[™] 2000 según lo recomendado por el fabricante. Para generar el virus pseudotipado , 1.5×10^6 células 293T cultivadas en placas de 10 cm se cotransfectaron con 14 g de ADN del clon VIH-1 y 7,5 g de ADN del plásmido de expresión de VSV con 3 ul de ADN Lipofectamine/ug . Sobrenadantes de cultivo 293T se cosecharon 72 h después de la transfección, se filtró a través de un filtro Millipore de 0,45 μm y se almacenaron a -80°C hasta su uso. La concentración de Ag p24 en sobrenadante de cultivo se realizó por ELISA utilizando el kit de VIH-1 Ag (Coulter , Hialeah , Florida). Tales sobrenadantes contenían de 1 a 2 g de proteína p24 viral por ml y 1×10^4 a 2×10^5 unidades infecciosas (UI) por ml . Como estimación, una multiplicidad de infección de 1 para las células T CD4+ es equivalente a aproximadamente 1 pg de p24 viral por célula. Las células se infectaron a 1 pg de p24 por célula durante 1 a 2 horas a 37°C , seguido de lavado en solución salina tamponada con

fosfato (PBS). Como control negativo, los astrocitos con infección simulada fueron inoculados con el sobrenadante de las células 293T no transfectadas. La infección se controló midiendo el contenido de p24 en los sobrenadantes celulares y lisados celulares mediante ELISA. Los lisados celulares se prepararon utilizando las instrucciones y tampón de lisis suministrados por el fabricante y de normalización para el número de células viables.

Expresión GFAP y análisis de Imágenes

Para el marcaje con inmunoperoxidasa, las secciones se incubaron durante la noche con un anticuerpo primario GFAP de conejo (DAKO, diluido 1:500) seguido de incubaciones en anticuerpo de cabra anticonejo (Sigma Chemical Co, DIL 01:50) y de conejo peroxidasa-antiperoxidasa anticuerpo (Sigma Chemical Co, DIL 1:100), respectivamente. Desarrollo de la reacción se lleva a cabo en una solución que contiene 0,03 % de DAB (Sigma Chemical Co) más peróxido de hidrógeno al 0,01 % en tampón de acetato 0,1 M. Después de la inmunotinción, 4'6'-diamino - 2 - fenilindol (DAPI) (0,1 g / ml, Sigma) se añadió durante 5 min a temperatura ambiente para teñir todos los núcleos de las células en los cultivos. Controles negativos del procedimiento se realizaron mediante la omisión del anticuerpo primario.

El nivel de expresión (área) y la intensidad de GFAP en astrocitos infectados y controles se midieron siguiendo los protocolos reportados. Para este objetivo, las secciones se observaron bajo condiciones de funcionamiento idénticas, tales como intensidad de luz, longitud de onda, y el umbral de escala de grises durante todo el experimento. Las imágenes fueron adquiridas con la misma ampliación con una cámara digital Olympus Q5 conectado a un microscopio óptico Zeiss Axiophot y digitalizados en imágenes de nivel de gris (Labombarda et al. 2003). Todas las imágenes obtenidas fueron importados en ImageJ (versión 1.42, de los Institutos Nacionales de Salud, <http://imagej.nih.gov/ij>). Estructuras GFAP-positivas fueron segmentadas mediante la definición de un primer nivel de fondo en un área de la sección sin inmunoreactividad específica. Este fondo se determinó mediante el examen dentro de la imagen de la sección de la distribución (disponibles en el software ImageJ) de píxeles por densidad óptica. Esta distribución tiene una cola que se aplanan en el valor más bajo de densidad óptica (dentro del tejido). Este valor se consideró el fondo. El umbral para la definición de un píxel como "inmunorreactiva" se fijó en 20 valores de gris de densidad óptica sobre el fondo (niveles de gris posibles eran de 0 a 255, de blanco a negro). De este modo, se obtuvo una imagen binaria de la zona ocupada por inmunoreactividad que

incluía todos los píxeles con densidades ópticas superiores a 20 niveles de gris sobre el fondo.

Densidad óptica relativa (ROD) se obtuvo después de una transformación de los valores de gris medio utilizando la fórmula $= \log(\text{gris } 256/\text{mean})$. Para la evaluación de la zona de células gliales inmunoteñidas, el área total de las células gliales positivos de GFAP se relacionó con el área total del campo evaluado dar un porcentaje de área. Por lo menos 10 campos diferentes se midieron en cada diapositiva. Se obtuvieron cuatro diapositivas de cada punto de tiempo después de la infección y los controles. Los datos fueron presentados como valores medios $\pm$ S.D.

Medición de la actividad de la telomerasa (TA)

Astroцитos murinos (1×10^5) se lisaron en tampón CHAPS y se incubaron durante 30 min en hielo. Después de la incubación, los lisados se centrifugaron a 14.000 g durante 20 min a 4° C. Las concentraciones de proteína del extracto se midieron usando el ensayo de Bradford, seguido por dilución de la concentración final de 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Entonces, TA de los extractos se midió por PCR en tiempo real (qPCR) amplificación cuantitativa de fragmentos de repetición telomérica, como hemos descrito en otra parte (Reynoso et al. 2010, Reynoso et al. 2012). El volumen total de la mezcla de reacción era 25 μL por pocillo, que contiene 12,5 μL 1X SYBR Green Master Mix (Applied), 0,1 g de TS cebador (5' - AATCCGTCGAGCAGAGTT - 3'), 0,05 g de imprimación ACX (5' - GCGCGGCTTACCCTT ACCCTTACCCTAACC -3'), 1 μL de RNasa libre de agua, y 10 μL de muestra. La mezcla de reacción se incubó durante 20 min a 25° C. Luego, la PCR se inició a 95° C durante 15 min, seguido de la amplificación de 40 ciclos (95° C durante 15 s y 60° C durante 60 s). Los ensayos se realizaron por triplicado. RNasa libre de agua y de calor eluatos inactivadas (85° C durante 10 min) se utilizaron como controles negativos. Los valores del ciclo umbral (Ct) se determinaron a partir de gráficas de amplificación semilog (log aumento de la fluorescencia frente al número de ciclos) y se comparan con las curvas de calibración generadas a partir de diluciones seriadas de los extractos de proteínas de las células HeLa. TA se cuantificó y expresó en relación a las células HeLa (RTA) utilizando la fórmula descrita por Herbert et al. (RTA = $10^{(\text{Ct} - \text{Ct muestra de control positivo}) / \text{pendiente}}$) (Hochreiter et al. 2006).

Determinación de la longitud de los telómeros

La longitud de los telómeros se determinó en astroцитos murinos por una qPCR como se describe en detalle previamente (Cawthon 2002, Fehrer et

al. 2006, Reynoso et al. 2012). En resumen, los números de repetición de copia de los telómeros (T) y un gen de copia única (S; 36B4 gen) fueron amplificados utilizando los primers: 5'- Tel1b CGGTTTGGTTGGGTTTGGGT TTGGGTTTGGGTTTGGGTT -3', 5'- tel2b GGCTTGCCTTAC CCTTACCCT TACCCTTACCC TTACCCT -3' y 36B4MF 5' - ACTGGTCTAGGACCCGAGA-AG - 3, 5' - 36B4MR TCAATGGTGCCTCTGGAGATT - 3', respectivamente. Diferentes concentraciones de ADN se utilizaron para generar una curva estándar (2 ng, 20 ng, 200 ng). Todas las muestras, tanto para el telómero y amplificaciones de genes de copia única, se realizaron por triplicado. Se usaron los valores de Ct generados para calcular la relación T / S para cada muestra usando la siguiente ecuación: $T/S = 2^{-Ct}$ (donde gen de copia única $Ct = Ct - Ct$ de los telómeros). Relación T / S es proporcional a la longitud del telómero (Cawthon 2009).

Tripán azul (prueba de la viabilidad celular)

Se utilizó la prueba de tinte de exclusión para determinar el número de células viables después de la exposición de los astrocitos murinos al VIH/ VSV. Al día 1, 3, 5, 7 y 13 astrocitos se trataron con tripsina, se expone a teñir, y luego se examinaron visualmente para determinar si las células incluyen el colorante. Las células vivas con las membranas celulares intactas excluyen azul tripán, mientras que las células muertas no lo hacen.

Análisis estadístico

Los datos fueron presentados como valores medios $\pm$ S.D. y la significación estadística se evaluó mediante ANOVA de una vía con prueba de comparación múltiple de Tukey utilizando GraphPad Prism versión 4 (GraphPad Software, San Diego, CA). Se consideraron los valores de p menores a 0,05 para ser estadísticamente significativos. Todos los datos que se muestran son representativos de al menos 4 experimentos independientes.

RESULTADOS

Los astrocitos murinos producen antígeno p24 de VIH- 1 después de la infección in vitro

VIH - 1 pseudotipado con VSV -G causa la infección productiva en astrocitos primarios murinos, revelando un pico de la producción de p24 a los 7 días después de la infección (Figura 1). La replicación se detectó en primer

lugar en el día 3. La exposición de los astrocitos murinos a VIH-1/VSV permite la entrada del VIH - 1 en estas células y aumenta la susceptibilidad de los astrocitos a la infección y replicación del VIH - 1.

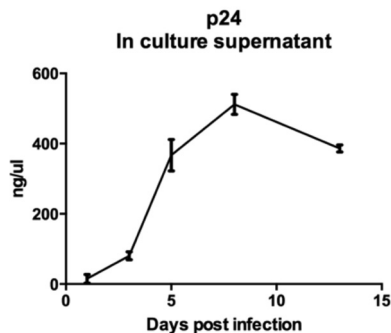


Fig. 1a

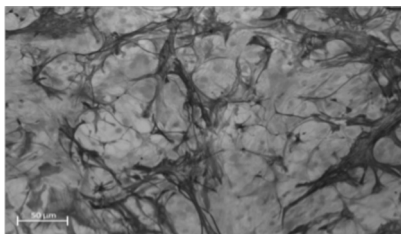
Figura 1. Infección de astrocitos primarios merinos monitoreados por la expresión del antígeno p24 del VIH. Resultados se expresan como valores promedio obtenidos de cuatro experimentos independientes.

Evaluación cuantitativa de la expresión de GFAP

Los astrocitos expresan GFAP, sin embargo, la expresión de GFAP se aumenta durante la activación de astrocitos y astrogliosis. Debido a que la activación astrogliosa también se asocia con la exposición al VIH, se investigó el papel de la infección por VIH/VSV en la expresión de GFAP.

Tras los análisis cuantitativos, la intensidad y el área de la inmunomarcación de GFAP de los astrocitos infectados con VSV VIH / y modelo de infectados (control) se representó gráficamente (Figura 2). Posteriormente, para correlacionar la expresión de GFAP con la infección por VIH, analizamos la expresión

dependiente del tiempo de GFAP, y la producción de antígeno p24 de HIV en sobrenadantes de cultivo de astrocitos. Es claro que durante el progreso de la infección por VIH/VSV la expresión de GFAP en astrocitos primarios se incrementa con la máxima observada en el pico de concentración de



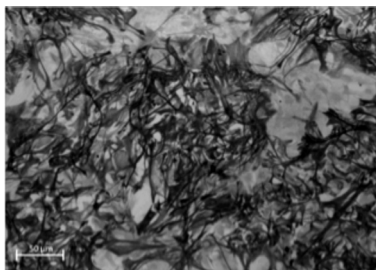
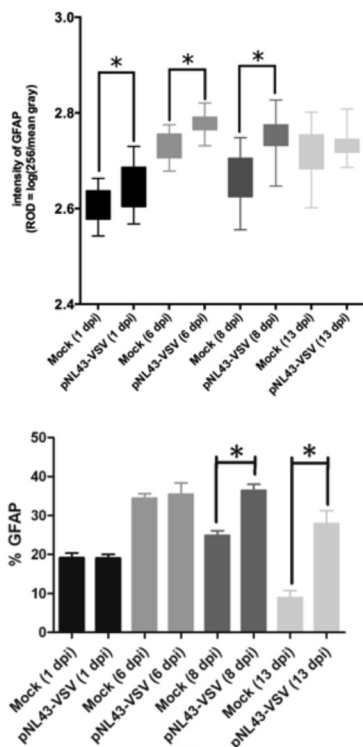


Figura 2. Expresión de la inmunoreactividad de la GFAP en astrocitos infectados con VIH/VSV (izquierda) y control (derecha) tras 8 días de infección.



p24. Sin embargo, las células GFAP positivas disminuyeron en los astrocitos con infección simulada aunque el número de células GFAP positivas no cambió significativamente en astrocitos infectados por pNL43 - VSV. El análisis estadístico (ANOVA) reveló aumentos significativos en la immuno-reactividad de GFAP (tanto de intensidad como del área) 8 días después de la infección en las células infectadas por el VIH / VSV en comparación con las muestras de control ($p < 0,0001$). La expresión de GFAP fue también significativamente mayor 13 días posteriores a la infección, pero con una intensidad similar. Por lo tanto, la inducción paralela de GFAP y p24 de HIV producción sugiere una posible participación de la infección por VIH en el aumento de la expresión de GFAP en astrocitos.

Densidad óptica relativa (ROD) como intensidad de expresión de la GFAP durante la infección con VIH/VSV de los astrocitos murinos.

Porcentaje de células expresando GFAP durante la infección con VIH/VSV. Diferencias significativas ($p < 0.001$) entre controles y células infectadas con VIH/VSV se indican con un asterisco (*).

Actividad de la telomerasa (TA)

Con el fin de mensurar la actividad de la telomerasa, se analizaron los astrocitos a 0, 1, 6, 8, y 13 días después de la infección que implica tiempos anteriores y posteriores al pico de la replicación del VIH y la viabilidad celular fue de $\geq 95\%$. La TA se midió por qPCR y se muestra como actividad relativa (RTA) a la de las células HeLa que se asume como 100 % (Herbert et al. 2006). Temprano después de la infección de VIH se observó una disminución significativa ($p < 0,001$) hasta la regulación en las células infectadas (hasta 6 días post- infección). En el día 8 y 13, los astrocitos infectados por el VIH mostraron una TA similar ($p > 0,05$) a los controles (Figura 3a). Se observó una fuerte correlación entre el aumento de la RTA en los astrocitos y la cantidad de antígeno p24 secretada ($R^2 = 0,7423$; coeficiente de correlación de Pearson, -0.8616 , $p < 0,0001$; Figura 3b). Por otra parte, a pesar de los dos marcadores celulares RTA y expresión GFAP fueron regulados después de la infección por VIH, se observó una correlación negativa pero no significativa cuando se consideraron los valores obtenidos en el 1, 6 y 8 dpi ($R^2 = 0,9912$; coeficiente de correlación de Pearson, -0.9956 , $p = 0,0599$), dado que la regulación de estos parámetros no se produjo de forma simultánea.

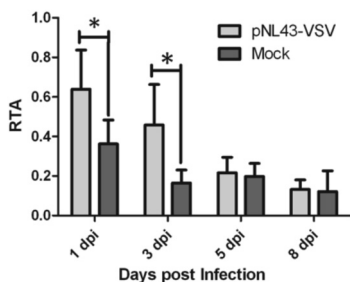


Figura 3a. Actividad de telomerasa en astrocitos murinos cosechados a diferentes tiempos post-infección. Diferencias significativas ($p < 0,001$) entre controles (mock) e infectados con VIH/VSV se indican con un asterisco (*).

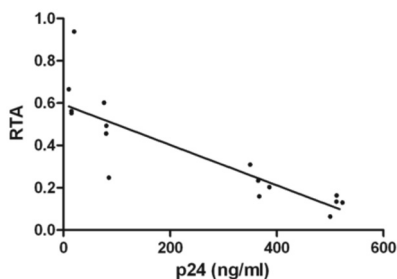


Figura 3b. Curva de correlación entre la actividad de telomerasa (TA) y los niveles de antígeno p24 en sobrenadantes de cultivo.

Longitud de los telómeros

Con el fin de probar las consecuencias de la activación de la telomerasa en los astrocitos infectados con VIH/VSV, se analizaron la longitud del telómero en astrocitos infectados de forma simulada frente a las células infectadas. A los 1, 6, 8, y 13 días después de la infección, se recogieron las células, se aisló ADN genómico, y se estudió la longitud de los telómeros por qPCR utilizando cebadores para las secuencias específicas de los telómeros de murino (t) frente a 36B4, un gen de copia única (S). La relación de T/S es por lo tanto proporcional a la longitud de los telómeros (Cawthon 2002). A las 6 de dpi, el telómero se mostró alargado de forma significativa ($p < 0,001$) en los astrocitos infectados con el VIH (Figura 4).

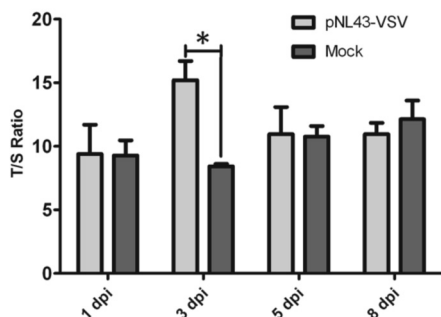


Figura 4. Longitud telomérica en astrocitos murinos cosechados a diferentes tiempos (1, 6, 8, y 13 días) tras la infección con VIH/VSV. Telómero (T) y gen de copia simple (S) fueron amplificados usando PCR en tiempo real, obteniéndose un T/S ratio proporcional a la longitud telomérica. Diferencias significativas ($p < 0.001$) entre controles (mock) y astrocitos infectados con VIH/VSV son indicados con un asterisco (*).

DISCUSIÓN

En el presente estudio, hemos demostrado que el VIH es capaz de inducir la activación y cambios dinámicos tanto en la actividad de la telomerasa como en la longitud de los telómeros en astrocitos murinos cultivados. Se sabe que los astrocitos en cultivo en condiciones basales muestran un patrón cíclico de alargamiento de los telómeros y la manteca y son capaces de dividirse por períodos mucho más largos de tiempo que la microglia (Flanary y Streit 2004). Dicha capacidad replicativa es finita después que las células

madre neurales murino se diferencian en astrocitos porque la actividad de la telomerasa es limitada y, con cada división celular, los telómeros se acortan progresivamente (Miura et al. 2001). Además, otras funciones extra- telómero se ejercen por esta enzima celular incluyendo la regulación de la distribución de calcio (Lin et al. 2007), el metabolismo (Chung et al. 2005), factor de crecimiento de la secreción (Smith et al. 2003), la función de las mitocondrias (Passos et al. 2007), el balance energético (Bagheri et al. 2006) y, la apoptosis (Massard et al. 2006).

Nosotros y otros hemos demostrado previamente que el VIH es capaz de modificar la capacidad de replicación mediante la modulación de la actividad de la telomerasa (Comandini et al. 2013, Franzese et al. 2007, Reynoso et al. 2006, Reynoso et al. 2010, Reynoso et al. 2012). La modulación negativa de la telomerasa celular y la erosión de los telómeros provoca la atrofia del tejido progresiva, fallo del sistema de órganos y deteriora las respuestas a lesiones de los tejidos (Jaskelioff et al. 2011). Recientemente, la medición de la longitud de los telómeros de los leucocitos de sangre periférica se propuso como un factor de susceptibilidad en el desarrollo del HAND (Malan - Muller et al. 2013).

Astrocitos activados pueden ejercer efectos tanto de protección como perjudiciales en las neuronas. La contribución de la activación de astrocitos a neuropatogénesis mediada por el VIH también implica la desregulación de astrocitos después de la exposición a partículas de VIH, proteínas virales, citocinas y otros mediadores secretadas por las células infectadas por el VIH (Borjabad et al. 2010). Estudios *in vitro* indican que muchos de estos productos modulan significativamente la fisiología de astrocitos, que a su vez puede alterar las interacciones esenciales de los astrocitos con otras células en el cerebro, en particular las neuronas (Wang et al. 2008). Aunque los estudios de interacción VIH - astrocito idealmente deberían llevarse a cabo con células humanas, astrocitos primarios sólo se pueden obtener a partir de tejidos fetales, pero teniendo en cuenta las dificultades inherentes en la obtención de esta fuente de varios donantes, hemos decidido utilizar tejidos de ratón para investigar el impacto de infección por el VIH en el proceso de los telómeros astrocito / telomerasa -envejecimiento. Para garantizar la homogeneidad de los objetivos celulares, recurrimos a cerebros obtenidos a partir de una sola cepa de ratón endogámico. Para lograr este objetivo, hemos utilizado los astrocitos murinos fetales como células permisivas a la infección altamente productiva del VIH cepa pNL4.3 capaz de entrar en este tipo de células CD4 negativa a través del pseudotipeado con la proteína de envoltura VSV-G (gli-

coproteína G del virus de la estomatitis vesicular). Los informes de otros grupos independientes indican que los astrocitos, los linfocitos y los macrófagos son susceptibles a la infección productiva por VIH pseudotipado tal como se evaluó mediante la detección de p24, entre otros enfoques (Canki et al. 2001, Nitkiewicz et al. 2004, Wang et al. 2008).

En el SNC de ratón, el programa de desarrollo de la expresión de GFAP muestra su primera detección al final de la gestación. Luego, después de unos pocos días con incremento, la expresión disminuye hasta alcanzar una meseta como un marcador para el envejecimiento del cerebro (Middeldorp y Hol 2011, Riol et al. 1992). Aquí, después de la exposición al VIH pseudotipado, los astrocitos murinos alcanzando un pico de producción de p24 a los 7 días después de la infección que muestran una activación simultánea y significativa como lo revela el aumento de la producción de GFAP. Esta diferencia podría estar relacionada con la acción de citoquinas tales como TNF- α e IL-1 producidas por los astrocitos infectados por el VIH, por aumento de la carga intracelular de proteínas dañadas por oxidación después de la infección viral (Ashraf y col. 2011), y por la acción directa de las proteínas del VIH, como Tat (Fan et al. 2011, Zou et al. 2010).

En nuestro estudio, los astrocitos infectados por el VIH representan un aumento precoz y transitorio de la actividad de la telomerasa después de la infección que puede contribuir al alargamiento de los telómeros. Tal fenómeno aparece inversamente correlacionado con la progresión de la infección y más allá de 3 días después de la infección, cuando la replicación viral había alcanzado un pico parámetros celulares, lograron niveles similares como los de los astrocitos no infectados. Esta actividad de la telomerasa fluctuante aparece reflejada en un patrón cíclico de alargamiento de los telómeros. En este trabajo, los resultados obtenidos mostraron que el aumento temprano en la actividad de la telomerasa en los astrocitos infectados por el VIH podría atenuar su proliferación y, por tanto, su efecto perjudicial hacia el daño neuronal (Qu et al. 2011). Dado que la actividad enzimática en los astrocitos aparece regulada sólo transitoriamente, como la función neuroprotectora podría eludirse durante el progreso de la infección por VIH, haciéndose inactiva luego y así volvería a aparecer su efecto perjudicial, contribuyendo a la neuropatogénesis viral. En conjunto, nuestros resultados sugieren que cuando el VIH induce TA en astrocitos podría contribuir a la protección celular, siendo ésta una estrategia viral para cambiar transitoriamente la fisiología celular que le permita preservar el escenario celular por más tiempo, mientras replica eficientemente.

A pesar de los beneficios de HAART, la prevalencia de la HAND ha persistido o incluso ha aumentado en las personas mayores. Entre varias hipótesis para explicar este fenómeno, la posible contribución del envejecimiento se ha postulado. Sin embargo, aún se desconoce si las proteínas del VIH están involucrados en el proceso de envejecimiento de los astrocitos lo cual merece una mayor investigación.

En contraste con nuestros resultados, Pollici et al informaron una apoptosis inducida por estrés oxidativo y acortamiento de los telómeros (Pollici et al. 2009). Varias diferencias podrían explicar la discrepancia. U373 es un línea celular humana inmortalizada en la que la longitud de los telómeros se mantiene como un requisito previo esencial para la proliferación celular indefinida, involucrando frecuentemente una alta actividad de la telomerasa (Bryan y Reddel 1997). Teniendo en cuenta que se utilizan partículas de tipo salvaje VIH, cambios celulares podrían ser promovidos por la acción directa de las proteínas virales tales como gp120 y Tat después de su interacción con los receptores celulares (Price et al. 2005). Mediante el uso de VSV-G-/VIH tales interacciones se evaden porque la entrada celular se produce por una vía endocítica dependiente de bajo pH (Aiken, 1997).

En conclusión, nuestros resultados arrojan luz sobre el papel de los astrocitos en la neuropatogénesis del VIH. Su infección por el VIH promueve dos fenómenos temporalmente diferenciados. Al principio, la activación de la telomerasa y el alargamiento de los telómeros que están estrechamente relacionada con la resistencia a la apoptosis y lesión, seguido por la activación de astrocitos que contribuye al daño neuronal. Nuestros datos podrían ser útiles en la comprensión de los mecanismos implicados en la persistencia mediada por el VIH mediante la alteración de sus procesos de envejecimiento relacionado con los telómeros que podrían ayudar en el desarrollo de modalidades terapéuticas en especial para los pacientes con HAND.

ABSTRACT

Although HAND (HIV-associated neurocognitive disorders) results from injury and loss of neurons, productive infection routinely takes place in cells of macrophage lineage. In such a complex context, astrocytosis induced by local chemokines/cytokines are one of the hallmarks of HIV neuropathology. Whether this sustained astrocyte activation is able to alter telomere-aging process is unknown. We hypothesized that interaction of HIV with astrocytes may

impact on astrocyte telomerase activity (TA) and telomere length in a scenario of astrocytic activation measured by expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP). To test this hypothesis, cultured murine astrocytes were challenged with pseudotyped HIV/vesicular stomatitis virus (HIV/VSV) to circumvent the absence of viral receptors; and GFAP, telomerase activity and telomere length were quantified. As an early and transient event after HIV infection, both TA activity and telomere length were significantly augmented ($p < 0.001$). Later, strong negative correlation (-0.8616 , $p < 0.0001$) between virus production and telomerase activity was demonstrated. Once HIV production reached a peak (7 dpi), the TA decreased showing similar levels to non-infected cells. In contrast, the astrocyte became activated exhibiting significantly increased levels of GFAP expression directly related to the level of HIV/VSV replication ($p < 0.0001$). Our results suggest that HIV-infected astrocytes exhibit early disturbance in their cellular functions such as telomerase activity and telomere length that may attenuate cell proliferation and enhance the astrocyte dysregulation, contributing to HIV neuropathogenesis. Understanding the mechanisms involved in HIV-mediated persistence by altering their telomere-related aging processes could aid in the development of therapeutic modalities for neurological complication of HIV infection.

PARTICIPACIÓN DE LAS QUIMIOQUINAS EN EL DESARROLLO DEL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH)

Dra. María Victoria Ramos

Colaboradora: Lic. María Jimena Abrey Recalde

Instituto de Medicina Experimental-CONICET. Academia Nacional de Medicina.

Buenos Aires. Argentina.

INTRODUCCIÓN

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es una enfermedad caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopenia y disfunción renal, considerada endemo-epidémica en nuestro país. La forma típica del SUH está ligada a infecciones por bacterias enterohemorrágicas del género *Escherichia Coli* productoras de toxinas Shiga (STEC). La toxina Shiga (Stx) se une a su receptor específico (Gb3) en el endotelio del glomérulo y el epitelio tubular, inhibiendo la síntesis proteica y generando focos de necrosis en el riñón. Además de la Stx, la respuesta inflamatoria es necesaria para el desarrollo del SUH. La depleción de monocitos/macrófagos (Palermo *et al*, 1999) ó de neutrófilos (Fernandez *et al*, 2006), reduce el daño inducido por la Stx, sugiriendo que éstas poblaciones participan en la patología.

Las quimioquinas también son moléculas que participan en la respuesta inflamatoria. Pueden interaccionar con sus receptores específicos expresados en los leucocitos, induciendo así tanto la activación como la atracción de monocitos, neutrófilos, linfocitos, hacia el sitio de inflamación. Acorde a esto, nuestro grupo ha reportado una disminución de leucocitos circulantes que expresan CX₃CR1⁺ (receptor para la quimioquina fractalquina) acompañado de la presencia de dichas células en biopsias de riñón de pacientes con SUH, sugiriendo que el CX₃CR1 participa en la fisiopatología de la enfermedad (Ramos *et al*, 2007). Por otro lado, también reportamos que en el modelo murino de SUH, desarrollado tras la inoculación ev con Stx, el bloqueo del receptor de quimioquinas CCR1 induce una mayor sobrevivencia de los ratones acompañado de menor daño renal y una disminución de la activación de la respuesta inflamatoria (Ramos *et al*, 2012). El CCR1, se expresa en neutrófilos, monocitos, linfocitos T, células NK, y puede interactuar con varios ligandos como MIP-1 α , RANTES, entre otros. Por otro lado, el receptor CCR5,

expresado en monocitos/macrófagos y linfocitos T, comparte con el CCR1 algunos de sus ligandos (RANTES, MIP-1 α). Otro receptor con implicancia en enfermedades renales es el CCR2, presente en monocitos y macrófagos (Boring *et al*, 1997). Su ligando, el MCP-1 es secretado por endotelio inflamado, como células de túbulo proximal de riñón en ratones y humanos con proteinuria (Tesch *et al*, 2008). En paralelo, se observa la presencia de macrófagos CCR2⁺ en la zona intersticial renal, sugiriendo que el MCP-1 participa en el reclutamiento de los leucocitos al riñón injuriado (Vielhauer *et al*, 2008). Por otro lado, también se ha reportado un efecto directo de MCP-1, sobre macrófagos cultivados *in vitro*, induciendo la síntesis de TNF α (Sodhi *et al*, 2007), y la liberación de óxido nítrico (Biswas *et al*, 2008). Esto sugiere que las quimioquinas además de participar en el reclutamiento de leucocitos pueden activarlos contribuyendo a la respuesta inflamatoria. Se postula que los leucocitos que logran infiltrar el riñón, atraídos por las quimioquinas producidas localmente, contribuyen al daño renal, sugiriendo que lo mismo ocurriría en el SUH. Por ello, se plantea como **objetivo general** del proyecto, estudiar la participación de las quimioquinas, como moléculas capaces de definir el desarrollo y evolución del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). Para llevar a cabo este objetivo general, se han planteado como **objetivos particulares**: -Analizar la expresión de receptores de quimioquinas en leucocitos de sangre periférica de pacientes con SUH durante el período agudo. -Evaluar los niveles de las quimioquinas en plasma de dichos pacientes con SUH.

RESULTADOS

Durante el período agudo de SUH, la población de monocitos circulantes, aumenta tanto en porcentaje como en número absoluto, y presenta alteraciones en la expresión de sus marcadores y en su funcionalidad (Fernandez *et al*, *J Leukoc Biol.*;78(4):853-61, 2005; Fernandez *et al*, *J Clin Immunol. Jun*;32(3):622-31; 2012).

Se ha reportado que la interacción entre los receptores de quimioquinas presentes en los monocitos y sus ligandos, participan en diferentes patologías inflamatorias. Teniendo en cuenta esto, y el rol esencial de estos leucocitos en el SUH, se analizó la expresión de los receptores de quimioquinas CCR1, CCR2 y CCR5 en monocitos de sangre periférica de pacientes con SUH durante el período agudo. Para ello se identificaron, los monocitos totales (CD14⁺) y a su vez se diferenciaron las dos subpoblaciones mayoritarias:

clásicos (CD14⁺CD16⁻) e inflamatorios (CD14⁺CD16⁺), mediante citometría de flujo. Como se observa en la *Figura 1*, el porcentaje de monocitos circulantes que expresan CCR1, CCR2 y CCR5 es mayor en los pacientes con SUH que en los dadores sanos.

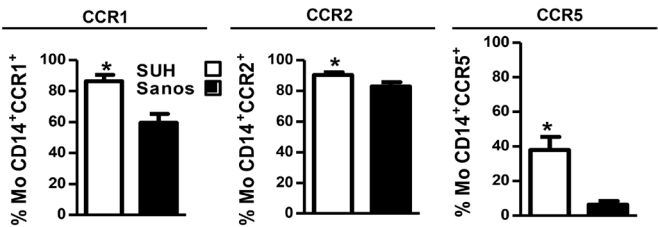


Figura 1: Porcentaje de monocitos totales que expresan CCR1, CCR2, ó CCR5 en pacientes con SUH y niños sanos. Estadística: $p<0.05$, test Mann Whitney, $n=12$.

En paralelo, se analizó la expresión por célula de estos receptores de quimioquinas tanto en la población de monocitos totales como de manera diferencial en cada subpoblación de monocitos: clásicos ó inflamatorios (*Tabla I*). En los dadores sanos, la mayoría de los monocitos clásicos expresan tanto CCR1 como CCR2, mientras que la expresión de CCR5 es mayor en los monocitos inflamatorios, coincidiendo con la bibliografía (*Balboa L et al, J Leukoc Biol. 90(1):69-75; 2011*). Sin embargo, en los pacientes con SUH, la expresión de CCR1 y CCR2 aumenta en los monocitos inflamatorios mientras que la de CCR5 aumenta en ambas subpoblaciones.

Tabla I: Intensidad media de fluorescencia (IMF) de cada receptor analizada por citometria de flujo. Estadística: * $p<0.05$ Sanos versus SUH en cada subpoblación, # $p<0.05$ monocitos clásicos versus inflamatorios dentro de los Sanos ó de los SUH.

Receptor de Quimioquinas	Monocitos Totales		Monocitos Clásicos		Monocitos Inflamatorios	
	Sanos	SUH	Sanos	SUH	Sanos	SUH
CCR1	18.4± 2.9	34.8±5.8*	17.4±2.6	31.3±5.9	15.5± 2.9	44.5±8.2*
CCR2	35.9±4.1	42.1±4.2	34.5±4.1	39.7± 3.6	24.2±3.7 [#]	37.1±5.3*
CCR5	7.9± 0.7	18.1±4.0*	5.4±0.5	15.4±3.8*	12.7± 0.8 [#]	30.1± 5.4* [#]

El aumento de expresión de CCR1 correlaciona positivamente con la severidad de la disfunción renal, tanto en la población de monocitos totales como en la subpoblación de monocitos inflamatorios (*Figura 2*).

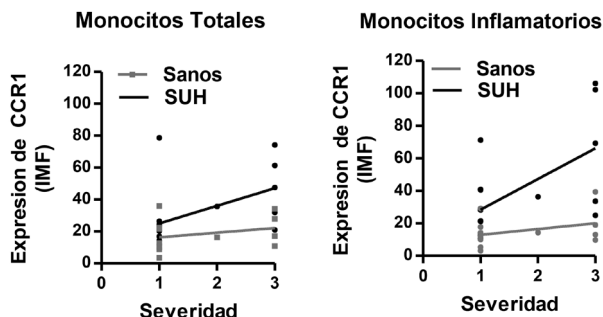


Figura 2: Análisis de la correlación entre la severidad de la disfunción renal con el incremento de CCR1. Estadística: Spearman $r = 0.58$, $*p < 0.05$

En situaciones inflamatorias tanto los receptores como los niveles de quimioquinas pueden ser alterados. Por este motivo, se analizó la capacidad quimioattractante de los plasmas recoletados de los pacientes. Para ello se purificaron monocitos de dadores sanos y se realizó un ensayo de migración utilizando como estímulo el plasma proveniente de dadores sanos y de pacientes con SUH con distinto grado de severidad (I: leve ó III: severo). Los monocitos transmigrados se contaron y marcaron para analizar por citometría de flujo, las subpoblaciones de monocitos clásicos ($CD14^+CD16^-$) e inflamatorios ($CD14^+CD16^+$). Como se observa en la *Figura 3A*, el plasma de pacientes con SUH induce la migración de monocitos de dadores sanos. Estos resultados demuestran que existen factores solubles en el plasma de pacientes con SUH con capacidad de inducir la migración de los monocitos. Es interesante remarcar que las muestras de plasma provenientes de pacientes con mayor severidad (Grado III) poseen mayor capacidad quimioattractante. Analizando dentro de los monocitos transmigrados (*Figura 3B*), el porcentaje de la subpoblación de clásicos e inflamatorios, se observó que el plasma de pacientes con SUH III, induce una migración mayor de los monocitos clásicos y menor de los monocitos inflamatorios en comparación al reclutamiento inducido por el plasma de niños sanos (control).

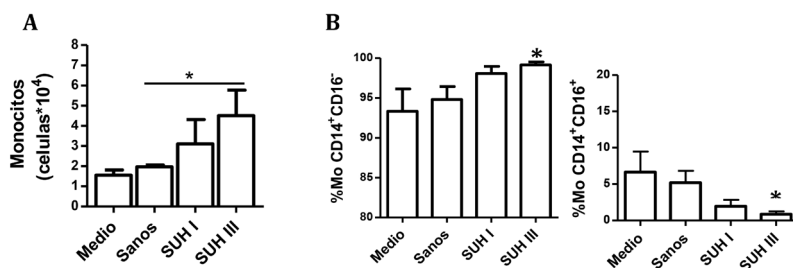


Figura 3: A) Recuento de monocitos de dadores sanos que migraron en respuesta a plasma de pacientes. B) Porcentaje de monocitos clásicos (CD14+CD16-) e inflamatorios (CD14+CD16+) que migraron en respuesta al plasma de pacientes. *p<0.05 versus Sanos, Mann Whitney test

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Nuestros resultados demuestran el aumento de la expresión de CCR1, CCR2 y CCR5 en los monocitos de pacientes con SUH durante el periodo agudo. Estas alteraciones pueden deberse a la activación o la maduración de los monocitos como resultado de la infección asociada a la Stx. Se ha reportado, que la expresión de CCR1 y CCR5 aumenta, mientras que la del CCR2 disminuye en monocitos diferenciados a macrófagos, correlacionando con mayor o menor funcionalidad respectivamente, evaluada como movilización de calcio luego del estímulo con los ligandos MIP1 α (CCR1, CCR5), y MCP-1 (CCR2)(A Kaufmann *et al*, *J Leukocyte Biology*, 69:248-252; 2001). Aunque todavía no hemos evaluado la funcionalidad de estos receptores en los pacientes, su incremento podría estar asociado a una mayor función llevando a una mayor activación ó reclutamiento de los leucocitos contribuyendo a la amplificación de la respuesta inflamatoria renal. Otra posibilidad sería que la expresión alterada sirva como sistema decoy para remover las quimioquinas circulantes (MIP1- α , RANTES y MCP-1). El plasma recolectado de pacientes con SUH (grado III) posee mayor capacidad quimioattractante que el de los niños sanos. Esto podría deberse a que durante el SUH, el endotelio y epitelio inflamado, junto a los leucocitos activados, secretan citoquinas y quimioquinas capaces de inducir la migración y activación de los monocitos, de esta manera podría explicarse que durante la evolución del SUH, cuanto más

grave es el cuadro, mayor secreción de estos factores se produce, reflejándose en una mayor capacidad del plasma de atraer leucocitos. Finalmente es interesante destacar que existe una correlación entre el aumento de CCR1 y la severidad del SUH. En línea con estos resultados, hemos demostrado que el CCR1 participa en la evolución del SUH en el modelo murino (*Ramos et al, AJP, 180(3):1040-8; 2012*).

Actualmente el SUH no tiene tratamiento específico, y el grado de lesión renal durante la fase aguda define la evolución a mediano-largo plazo. Esto hace que el 30 % de los niños sufra insuficiencia renal crónica llegando incluso a una insuficiencia terminal, requiriendo como única alternativa el transplante. Por este motivo, es importante comprender los mecanismos fisiopatogénicos del SUH y en especial cuales son las vías que participan en el daño renal, para poder intervenir y disminuir el daño renal inicial. Ya que nuestra hipótesis, se basa en que la interacción CCR-ligandos estaría mediando la activación ó el reclutamiento de los monocitos al riñón, todavía nos queda por investigar si éste mecanismo, participa en el daño renal.

RESUMEN

La microangiopatía trombótica y la falla renal aguda, son las características centrales del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). Distintas evidencias sostienen que para la patogénesis del SUH, se requiere tanto la interacción de la toxina Shiga (Stx) con su receptor específico en la células endoteliales y epiteliales renales, como la respuesta inflamatoria la cual juega un papel decisivo en la evolución de la enfermedad. Las quimioquinas presentes durante la respuesta inflamatoria, son capaces de interactuar con sus receptores específicos en los leucocitos, e inducir su activación y migración, y además han sido implicadas en diversos procesos patogénicos renales. Nosotros, hemos reportado que en pacientes con SUH, durante el período de fase aguda, la expresión del receptor de quimioquinas CX₃CR1 está alterada en los leucocitos, particularmente los monocitos. Aquí, demostramos que la expresión de los receptores CCR1, CCR2 y CCR5 se encuentra incrementada en los monocitos, acompañado de mayor capacidad quimioattractante del plasma de dichos pacientes. Por otro lado, el aumento de CCR1 correlaciona con el grado de severidad de la patología.

ABSTRACT

Thrombotic microangiopathy and acute renal failure are cardinal features of post-diarrheal hemolytic uremic syndrome (HUS). However, clinical and experimental data suggest that host's inflammatory response to bacterial virulence factors plays a pivotal role in the pathogenesis of the disease. These conditions are related to endothelial and epithelial cells damage induced by Shiga toxin (Stx), through the interaction with its specific receptor on endothelial and epithelial cells. Chemokines are implicated in different renal pathological process due to their capacity to induce activation and chemotaxis of leukocytes. We have demonstrated that the expression of the chemokine receptor CX₃CR1 is altered on monocytes. In this study we show that CCR1, CCR2 and CCR5 expression on monocytes is upregulated and that plasma from HUS patients has the capacity to induce chemotaxis on healthy monocytes. The modulation of CCR1 expression correlates to the severity of HUS patients.

ESTRATEGIAS PARA REVERTIR LA INMUNOSUPRESIÓN INDUCIDA POR ENDOTOXINAS BACTERIANAS

Rearte María Bárbara

Instituto de Medicina Experimental (IMEX)-CONICET.

Academia Nacional de Medicina

INTRODUCCIÓN

Los procesos sépticos constituyen una de las principales causas de muerte en unidades de cuidados intensivos alcanzando una tasa de mortalidad del 30% de los pacientes¹. Si bien durante años se pensó a este fenómeno como un evento asociado a una inflamación exacerbada en respuesta a una infección, los tratamientos con diferentes agentes anti-inflamatorios en los últimos 30 años y en más de 25 ensayos clínicos han fracasado rotundamente en un período conocido como la “tumba de las compañías farmacéuticas^{2,3}”. Este fracaso en el desarrollo de terapias adecuadas, tiene que ver, en parte, con la carencia -que aún hoy persiste- sobre la comprensión plena de los mecanismos fisiopatogénicos que acompañan a las sepsis. Así, relevando datos de mortalidad en los cuadros de sepsis, se ha observado que si bien existe una incidencia de muerte en las fases tempranas donde predomina la fase inflamatoria y sobre la cual se han dirigido las diversas estrategias terapéuticas, la tasa de mortalidad es mucho mayor **-en el 70% de los casos-** en la fase anti-inflamatoria que cursan con una inmunosupresión severa^{4,5}.

A nivel global, la sepsis continúa siendo una causa importante de mortalidad en todo el mundo. Así, en EEUU, con más de 210.000 muertes/ año, constituye la 12° causa de muerte en ese país⁶. En el 50% de las sepsis las infecciones se deben a bacterias Gram-negativas, cuyos lipopolisacáridos (LPS) de membrana -también conocidos como endotoxinas- son los agentes causales principales del proceso inflamatorio así como de la fase siguiente, anti-inflamatoria e inmunosupresora^{7,8}.

Se han propuesto numerosos mediadores como factores causales de la inmunosupresión en sepsis. Entre ellos, citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β , mediadores lipídicos como las prostaglandinas (PG-E₂), neuromediadores y catecolaminas⁹⁻¹⁵. Además, se ha reportado la participación

de ciertas poblaciones celulares que contribuyen a la depresión inmune, como las células T regulatorias y las células mieloides supresoras^{16,17}. Por otra parte y sobre la base de trabajos propios, nosotros consideramos también que **los glucocorticoides** (GC) son agentes centrales e insoslayables en el establecimiento de estos fenómenos de inmunosupresión en procesos sépticos¹⁸⁻²⁰. Así, hemos demostrado la recuperación de la respuesta inmune humoral y celular con mifepristone (RU486), un antagonista de receptores para glucocorticoides^{19,20} en un modelo murino de inmunosupresión inducido por LPS. No obstante, a fin de profundizar más sobre dicho concepto y con la finalidad de descartar la posibilidad de cualquier efecto indeseable o secundario del tratamiento con RU486, otros moduladores de GC fueron evaluados en este trabajo.

Así, la dehidroepiandrosterona (DHEA), un precursor de hormonas esteroideas con efectos anti-glucocorticoides^{21,22}, y el metirapone (MET), un inhibidor de la síntesis de corticosterona^{23,24}, fueron evaluados en su capacidad para restaurar la respuesta inmune en un modelo murino de inmunosupresión inducida por LPS. En resumen, nuestros resultados indican que, de manera similar a lo observado con RU486, tanto la DHEA como el MET podrían desempeñar un papel importante en la restauración de la respuesta inmune humoral y celular en ratones inmunosuprimidos por LPS, destacando la participación central de los GC en este fenómeno.

MATERIALES Y METODOS

Ratones

Se usaron ratones BALB/c hembras de 12-16 semanas de edad de 20-25g de peso.-

Inmunosupresión inducida por LPS

Se realizó un tratamiento con diferentes dosis crecientes de LPS durante 12 días consecutivos como se describió previamente²⁰.

Administración de Drogas

Utilizamos una dosis de DHEA de 40mg/Kg disuelta en propilenglicol y administrada vía subcutánea. El MET se disolvió en agua deionizada y se utilizó a una dosis de 80 mg/kg administrada vía intraperitoneal.

Inmunización y drogas

DHEA. Ratones inmunosuprimidos se inocularon con DHEA a las -4, -2 y 3 hs de la inmunización con GRc (5×10^8 /ratón; i.p.). Al día siguiente, se dieron tres dosis en intervalos de 3hs. Se continuó con una dosis diaria durante los restantes 4 días.

MET. Ratones inmunosuprimidos se inocularon con MET a las -3, 2 y 4hs de la inmunización. Al día siguiente, se dieron tres dosis a intervalos de 3hs. Siete días post inmunización fueron sacrificados; se tomó suero y bazos.

Reacción de hipersensibilidad

DTH. Ratones inmunosuprimidos fueron sensibilizados con GRc (2×10^8 GRc/ratón; i.p.) 24hs post LPS. Ratones control fueron sensibilizados utilizando el mismo esquema. Luego se trataron con dosis diarias de DHEA o MET durante los siguientes 4 o 2 días respectivamente. Al 6^{to} día fueron desafiados con 1×10^8 GRc vía subcutánea en almohadilla plantar. El grosor de la almohadilla se midió con micrómetro antes y 24hs post desafío. Cálculo: espesor de almohadilla después del desafío/espesor antes del desafío.

CHS. Ratones inmunosuprimidos fueron sensibilizados por topicación con 50 μ l de 1% de FITC (en acetona/ dibutil-ftalato) en la región ventro-lateral 24hs post LPS. Ratones control fueron sensibilizados utilizando el mismo esquema. Luego se trataron con DHEA o MET como se indicó para DTH. En el día 6 fueron desafiados con 10 μ l de 1% a FITC sobre ambos lados del pabellón auricular. Se midió la inflamación del pabellón con micrómetro antes y 24hs post desafío. Cálculo: grosor del pabellón después de desafío/ grosor antes del desafío.

Ensayo de hemaglutinación

La respuesta de anticuerpos (Ab) a GRc se evaluó mediante un ensayo de hemaglutinación, como fue descripto anteriormente²⁰.

Ensayo de proliferación de esplenocitos

Los esplenocitos (4×10^5 células/well) fueron colocados en 200 μ l de medio completo (RPMI1640-10% SFB, 1% antibiótico) sobre placas de 96 wells en presencia o ausencia de Con A (2 μ g/ml). Se incubaron durante 72 horas a 37°C y fueron pulsadas con 1 μ Ci de [³H] timidina 18 horas antes del cosechado. La actividad proliferativa se calculó midiendo la incorporación de ³H-timidina. Los resultados fueron expresados como la media de cuentas por minuto (c.p.m.) de pocillos por triplicado menos el c.p.m. basal de pocillos que fueron pulsados pero no estimulados (Δ c.p.m.).

Citometría de flujo

Los esplenocitos (células 1×10^6) fueron incubados con los siguientes anticuerpos: FITC-CD4, PE-CD8, Cy5PE-CD45R/B220 durante 30 minutos a 4°C. Se lavaron y se evaluaron por citometría de flujo.

Histología

Después de la fijación en formol 10%, bloques de tejido esplénico fueron deshidratados y finalmente embebidos en parafina. Se realizaron secciones semi-seriadas y se tiñeron con hematoxilina-eosina, o se analizaron por inmunohistoquímica.

Inmunohistoquímica

Panel de Abs: anti-CD20 para células B, anti-CD3 para células T. Para el reconocimiento de subtipos de células T se utilizó anti-CD4 y anti-CD8. Se incubó con Abs primarios 18hs en cámara húmeda. Los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina y se analizaron por microscopio.

Análisis estadísticos

Los valores se expresaron como la media $\pm$ SEM de n observaciones. ANOVA de una vía, seguido por una prueba de Student-Newman-Keuls como prueba post hoc para múltiples comparaciones. Todos los test estadísticos fueron interpretados de forma de dos colas y un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

DHEA y MET restauran la respuesta inmune humoral primaria en ratones inmunosuprimidos inducido por LPS

Para evaluar el efecto del tratamiento con DHEA o MET a nivel de la respuesta inmune, ratones inmunosuprimidos fueron tratados con cada una de las drogas y luego inmunizados con glóbulos rojos de carnero (GRc). Siete días después de la inmunización se sangraron y se evaluó la respuesta inmune humoral. La **figura 1** muestra una profunda disminución en el título de Abs anti-GRc en ratones inmunosuprimidos comparado con el grupo control. La administración de DHEA o MET permitió una parcial pero significativa restauración de la respuesta inmune humoral.

DHEA y MET restauran la respuesta inmune celular en ratones inmunosuprimidos inducido por LPS

Se llevaron a cabo experimentos *ex vivo* con el fin de determinar si la DHEA y el MET fueron capaces de superar la inmunosupresión inducida por LPS a nivel de la proliferación celular. Para esto, ratones inmunosuprimidos fueron tratados con DHEA o MET en sus diferentes protocolos y al 7^{mo} día se extrajeron los bazo y se realizó un ensayo de proliferación estimulados con Con A. Como se muestra en la **figura 2**, la proliferación de esplenocitos a partir de ratones inmunosuprimidos fue significativamente inferior a la observada en el grupo control. Sin embargo, en ratones inmunosuprimidos tratados con DHEA o con MET se observó una recuperación parcial de la respuesta proliferativa. Además, realizamos dos experimentos adicionales *in vivo*, utilizando una reacción de hipersensibilidad retardada de tipo IV (DTH) con GRc y una reacción de hipersensibilidad por contacto (CHS) con FITC. Como se muestra en la **figura 3**, la DTH y la respuesta de CHS fueron significativamente menores en ratones inmunosuprimidos. Sin embargo, la administración de DHEA permitió una restauración completa tanto de la reacción DTH como de la CHS (**figura 3a, b**). El tratamiento con MET también indujo una restitución de la inmunidad celular para ambas reacciones en ratones inmunosuprimidos (**figura 3c, d**).

DHEA y MET no restauran el número de células T CD4 en bazo pero promueven una reorganización parcial de la arquitectura esplénica y de la distribución de linfocitos B y T en ratones inmunosuprimidos

Con el fin de evaluar si los ratones inmunosuprimidos presentan alguna alteración celular o histológica a nivel del bazo, examinamos, en primera instancia, linfocitos T y B mediante citometría de flujo. Además, evaluamos el efecto de los tratamientos sobre dichos parámetros. La **Tabla 1** muestra una disminución en el porcentaje y número de linfocitos T CD4 en bazo de ratones inmunosuprimidos. Por otro lado, no hubo diferencias en los linfocitos T CD8 y B a partir de ratones inmunosuprimidos versus controles. La administración de DHEA o MET no parecen modificar ninguno de estos parámetros evaluados en ratones inmunosuprimidos. A nivel histológico se observó un incremento relativo de la región de la pulpa roja debido a una disminución de los componentes celulares de la pulpa blanca en ratones inmunosuprimidos. El tratamiento con DHEA o con MET restauró parcialmente el patrón histológico en ratones inmunosuprimidos alcanzando una semejanza estructural con un bazo normal (**figura 4a**). La inmunohistoquímica reveló una disminución de

linfocitos T CD4 y CD8 y de células B CD20 en nódulos de ratones inmunosuprimidos (**figura 4b d y e**). En contraste, los bazo de ratones inmunosuprimidos tratados con DHEA o con MET mostraron un aumento de la intensidad de CD20 dentro de folículos (**figura 4b**) y una reorganización de linfocitos T CD4 en los PALS y de linfocitos T CD8 inter-foliculares para ambos grupos (**figura 4d y e**).

CONCLUSIÓN

En este trabajo demostramos que DHEA y MET fueron capaces de restaurar la síntesis de anticuerpos como así la capacidad proliferativa de células T en ratones inmunosuprimidos. Si bien algunos autores han demostrado que la apoptosis de células linfoides sería uno de los mecanismos principales asociados a la inmunosupresión³⁹, nuestros resultados demuestran que éste no sería el único mecanismo dado que la recuperación parcial de la competencia inmunológica inducida por DHEA y MET demuestra que al menos algunos de los clones celulares comprometidos en la respuesta fueron funcionalmente afectados pero no eliminados por completo por el tratamiento con LPS. También observamos que no sólo el tratamiento con DHEA, sino también la administración de MET, restauraron completamente tanto la DTH como la reacción CHS en ratones inmunosuprimidos. Así, nuestros resultados sugieren que los glucocorticoides juegan un rol importante en la depresión de la función inmune dependiente de células T en un modelo murino de inmunosupresión inducida por LPS. Por otro lado, mediante citometría observamos una disminución en el número de linfocitos T CD4 en bazo de ratones inmunosuprimidos. Estos datos concuerdan con trabajos donde demuestran un incremento en el nivel de apoptosis en poblaciones linfocitarias en modelos de sepsis experimental y en patients^{39,41}. Si bien no observamos ninguna modificación de los parámetros evaluados por citometría en los grupos tratados con drogas, los estudios histológicos revelaron que ambos fármacos promueven una reorganización de la arquitectura del bazo en ratones inmunosuprimidos. Por otro lado, los estudios de inmunohistoquímica revelaron que ambos tratamientos promueven una mejora parcial de la distribución y la ubicación específica de los diferentes compartimentos celulares. En resumen, las evidencias presentadas en este estudio nos permiten confirmar el rol central de los glucocorticoides en la inmunosupresión inducida por LPS. La modulación de los mismos podría constituir una importante herramienta

terapéutica para reinstalar una respuesta inmune activa en pacientes con sepsis tardía.

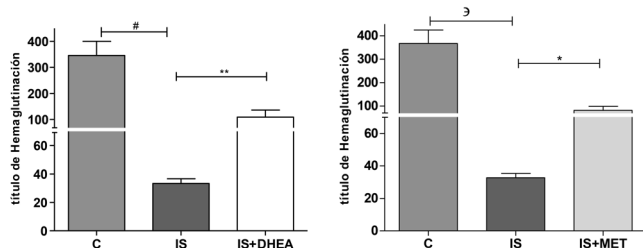


Figura 1.

Ratones inmunosuprimidos inducido por LPS fueron sometidos a un esquema de tratamiento con DHEA o MET e inmunizados con GRc. Ratones control no inmunosuprimidos fueron inmunizados con el mismo esquema. Siete días después de la inmunización se obtuvieron muestras de suero y se evaluó el título de anticuerpos anti-GRc mediante un ensayo de hemaglutinación. Los resultados son expresados como la media (título de Hemaglutinación) $\pm$ SEM de 4 experimentos diferentes ($n=5-6$ animales por grupo). C= naive inmunizado; IS= inmunosuprimido inmunizado; IS+DHEA= inmunosuprimido inmunizado tratado con DHEA; IS+MET= inmunosuprimido inmunizado tratado con MET # y $\Delta < p 0,05$ vs. C; * $< p 0,05$ vs. IS.

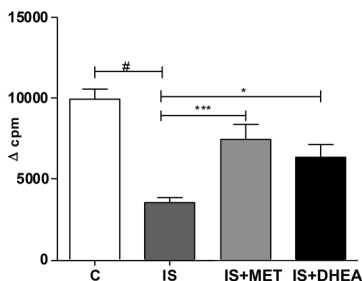


Figura 2.

Esplenocitos de los diferentes grupos experimentales fueron evaluados para un ensayo de proliferación inespecífica incubados con Con A. Los resultados son expresados como la media (Δ cpm) $\pm$ SEM de 3 experimentos diferentes ($n=4$ animales por grupo). C= normales; IS= inmunosuprimido; IS+MET= inmunosuprimido tratado con MET; IS+DHEA= inmunosuprimido tratado con DHEA. # $<p$ 0,05 vs. C; * $<p$ 0,05 vs. IS.

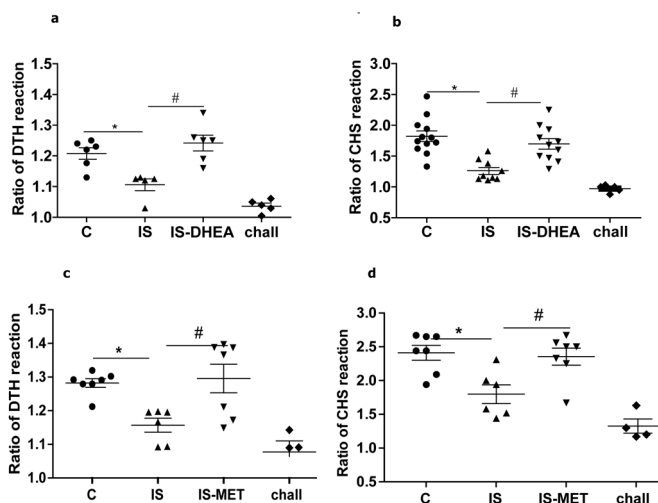


Figura 3.

Ratones inmunosuprimidos se sensibilizaron con una inyección intraperitoneal de GRc (a) o con FITC (b) en su región ventro-lateral sobre el día 1. Veinticuatro horas más tarde los animales fueron tratados o no con DHEA o MET administrada diariamente durante los siguientes 4 o 2 días respectivamente. En el sexto día los animales fueron desafiados con GRc en la almohadilla de la pata o bien con FITC en ambos lados de una oreja, respectivamente. El grosor de la almohadilla de la pata y de la oreja se midió antes de la exposición y 24 hs después de la estimulación. Los ratones control fueron tratados con el mismo esquema para cada uno.

Grupo chall fue desafiado pero no recibió la sensibilización. Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar de la media de la relación del espesor después de la exposición al antígeno/espesor antes del desafío

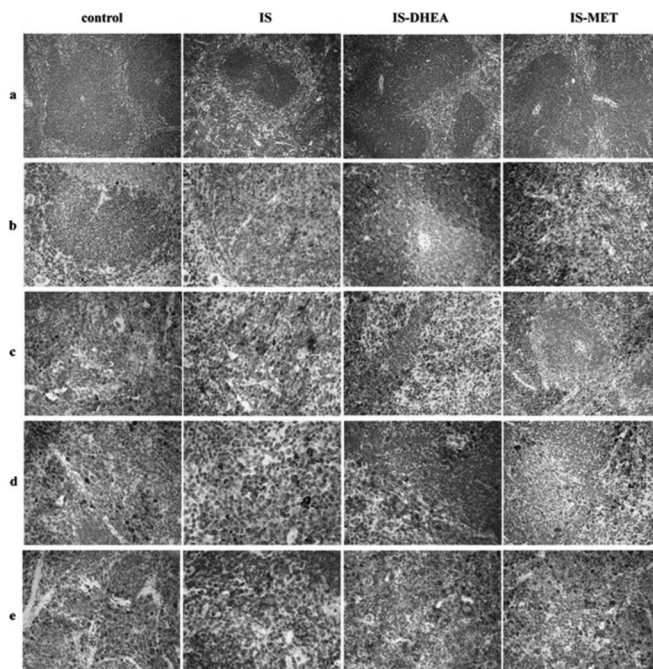


Figura 4.

(a) Hematoxilina-eosina. Bazo Normal (C): folículos de la pulpa blanca regulares en forma y tamaño con pulpa roja proporcional (magnificación original 250X); Bazo de ratón Inmunosuprimido (IS): folículos pequeños con forma irregular, no aparente zona marginal y un incremento relativo de la pulpa roja (magnificación original 250X); Bazo de ratón Inmunosuprimido tratado con DHEA (IS-DHEA): restauración parcial de la arquitectura del bazo con folículos irregulares y con un ligero predominio de la pulpa roja (magnificación original 250X); Bazo de ratón Inmunosuprimido tratado con MET (IS-MET): folículos con formas y tamaños regulares parcialmente recuperado; relación pulpa blanca / pulpa roja recuperada (magnificación original 250X). Inmunohistoquímica, inmuno-marcación para anti-CD20 (b). Bazo control presenta linfocitos B dispuestos en la región periférica del folículo; en bazo de IS se observan pocos linfocitos B mientras que en bazos provenientes de IS-DHEA o IS-MET muestran una abundante disposición de células B dispuestos en la misma región (magnificación original 250X, excepto IS-MET que fue 400X). (c) Anti-CD3. Tanto en bazo control como en bazos de IS-DHEA e IS-MET se observa la presencia de linfocitos T dispuestos en la zona del manto y en la pulpa roja. En bazos de IS se observa una menor disposición de linfocitos T en la región de pulpa roja (magnificación original 250X, excepto para IS-DHEA: 400X e IS-MET: 100X). (d) Marcación con anti-CD4 y (e) con anti-CD8. Bazo control muestra linfocitos T CD4 y CD8 en las zonas inter-foliculares; en IS se observan pocas células TCD4 en la periferia del folículo y células T CD8 dispersas en las áreas inter-foliculares; bazos de IS-DHEA mostraron linfocitos T CD4 en la periferia del folículo y en los PALS, así como linfocitos T CD8 en las áreas inter-foliculares; en IS-MET se observó linfocitos T CD4 en los PALS y linfocitos T CD8 dispersos en la pulpa roja (magnificación original: 400X, excepto para anti-CD4 in IS-MET: 250X).

y cada punto representa un ratón individual. IS: ratones inmunosuprimidos; IS-DHEA: ratones inmunosuprimidos tratados con DHEA; IS-MET: ratones inmunosuprimidos tratados con MET; C: ratones control. * $p < 0,05$ IS versus control; # $p < 0,05$ IS versus IS-DHEA y versus IS-MET.

Tabla 1.

	CD4		CD8		B220	
	% ^(a)	no.X10 ⁶	% ^(a)	no.X10 ⁶	% ^(a)	no.X10 ⁶
Control	27.1 ±1.0	19.4 ±1.9	11.7 ±0.8	8.3 ±1.4	53.2 ±0.7	36.6 ±4.3
IS	20.2 ±0.8*	12.9 ±1.2*	10.7 ±0.6	7.1 ±0.9	59.5 ±0.9	38.8 ±4.3
IS-DHEA	20.7 ±1.7*	9.9 ±1.7*	11.7 ±0.7	5.6 ±0.6	57.9 ±2.8	32.1 ±1.2
IS-MET	20.2 ±0.4*	12.8 ±1.1*	11.3 ±0.7	7.2 ±0.6	57.8 ±1.0	36.8 ±2.9

(a) Los valores en porcentajes fueron calculados en el *gate* de linfocitos definido por características de FSC and SSC. Los resultados son expresados como la media ± SEM de 8 ratones por grupo. Los datos representan 2 experimentos independientes. * $p < 0.05$ versus control.

ABSTRACT

Prior exposure to endotoxins renders the host temporarily refractory to subsequent endotoxin challenge (endotoxin tolerance). Clinically, this state has also been pointed out as the initial cause of the non-specific humoral and cellular immunosuppression described in these patients. We recently demonstrated the restoration of immune response with mifepristone (RU486), a receptor antagonist of glucocorticoids. Here we report the treatment with other modulators of glucocorticoids, i.e. dehydroepiandrosterone (DHEA), a hormone with anti-glucocorticoid properties, or metirapone (MET) an inhibitor of corticosterone synthesis. These drugs were able to partially, but significantly, restore the humoral immune response in immunosuppressed mice. A significant recovery of proliferative responsiveness was also observed when splenocytes were obtained from DHEA- or MET-treated immunosuppressed mice. In addition, these treatments restored the hypersensitivity response in immunosuppressed mice. Finally, although neither DHEA nor MET improved the reduced CD4 lymphocyte count in spleen from immunosuppressed mice, both treatments promoted spleen architecture reorganization, partially restoring the distinct cellular components and their localization in the spleen. The results from this study indicate that DHEA and MET could play an important

role in the restoration of both adaptive humoral and cellular immune response in LPS-immunosuppressed mice, reinforcing the concept of a central involvement of endogenous glucocorticoids on this phenomenon.

ROL DE LOS MEDIADORES LIPÍDICOS EN LAS FUNCIONES DEL TROFOBlasto DE PRIMER TRIMESTRE. BÚSQUEDA DE POSIBLES BLANCOS FARMACOLÓGICOS PARA EL MEJORAMIENTO DE LA TASA DE IMPLANTACIÓN.

Dra. María Laura Ribeiro, Dra. Micaela Sordelli, Lic. Jimena Beltrame.
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO), Facultad de Medicina
(CONICET – UBA).

ANTECEDENTES Y OBJETIVO GENERAL.

Los abortos espontáneos están estrechamente relacionados con fallas en la implantación y son una preocupación tanto en el plano social como económico. Aproximadamente el 12-14% de los embarazos detectados clínicamente terminan en un aborto espontáneo. Al menos el 50% de estas pérdidas pueden atribuirse a fallas genéticas. En este último caso, la mayoría de las mujeres podrán tener futuros embarazos que llegarán a término exitosamente. Sin embargo, en el 1-2% de los casos, el aborto espontáneo se repite sucesivas veces. La pérdida de tres o más embarazos de menos de 20 semanas de gestación se conoce como aborto recurrente. A pesar de las numerosas investigaciones al respecto, las causas y el tratamiento para esta patología permanecen sin conocerse. Si bien con las técnicas de fecundación asistida se han logrado superar varios obstáculos durante las primeras etapas del proceso reproductivo, la implantación en la cavidad uterina parece ser un paso limitante en la aplicación de estas nuevas tecnologías. La alta tasa de fallas durante la implantación, provoca que solo el 30% de los tratamientos se complete exitosamente. Hace ya varios años que se están buscando marcadores farmacológicos relacionados con estos procesos debido a su potencial valor como blancos terapéuticos. Esta situación refleja la urgencia clínica de conocer los mecanismos moleculares y fisiológicos que son la base de la intercomunicación materno-fetal durante la preñez temprana.

Durante la implantación, el trofoblasto desarrolla funciones que son fundamentales ya que le permitirán adentrarse en la matriz endometrial. Cuando la invasión del trofoblasto no se produce o es deficiente, la remodelación del lecho vascular, y por lo tanto el éxito de la gestación, se ven seriamente comprometidas. Algunas de las patologías obstétricas más frecuentes como

el aborto recurrente o la preeclampsia, están directamente relacionadas con problemas en la formación del lecho vascular de la interfase materno-fetal. Además, los procesos de apoptosis y de proliferación celular han sido identificados como parte normal del crecimiento y diferenciación del trofoblasto. Durante la gestación, el trofoblasto expresa proteínas pro y anti-apoptóticas sugiriendo que su susceptibilidad a las señales de apoptosis varía en los diferentes estadios de la preñez y podría ser importante durante la invasión y anclaje del trofoblasto al endometrio materno.

Hace ya varios años se ha observado que en el epitelio luminal adyacente a la zona donde se implanta el blastocisto se produce un cambio en la composición de lípidos que se interpreta como una movilización de precursores para la síntesis de moléculas lipídicas que participan de la formación de nuevos vasos y de la transformación de los fibroblastos endometriales en células deciduales. Es así que se postula un nuevo concepto, el de la participación de moléculas lipídicas en el establecimiento de la preñez, entendiéndolas ya no como simples componentes estructurales de las membranas sino como mediadores biológicamente activos. Sin embargo, aún no está claro cómo funcionan las interacciones moleculares entre esta compleja red de mediadores.

En este trabajo hemos estudiado en particular la interrelación que ocurre entre tres mediadores de origen lipídico como la anandamida (AEA), las prostaglandinas (PGs) y el ácido lisofosfatídico (LPA). La elección de estas moléculas responde a la vasta bibliografía ya publicada por otros autores y por nuestro laboratorio sobre su regulación en el útero murino y de rata. Estos trabajos, demuestran la participación de la AEA, las PGs y el LPA en la implantación, especialmente en los procesos que tienen lugar en la cara materna de la interfase materno-fetal. En nuestro laboratorio estamos interesados en el estudio de la participación de estos mediadores lipídicos sobre las funciones críticas del trofoblasto al momento de la implantación, ya que el trofoblasto conforma la componente fetal de la interfase materno-fetal.

En base a estos antecedentes **el objetivo principal** de este trabajo fue investigar el rol que cumplen diferentes moléculas lipídicas (el ácido lisofosfatídico, las prostaglandinas y la anandamida) en importantes funciones del trofoblasto al momento de la implantación, específicamente en la invasión, la migración y la proliferación.

Modelo experimental

Para llevar adelante este objetivo seleccionamos como modelo experimental la línea celular de trofoblasto de primer trimestre HTR-8/SVneo. Uno de los principales problemas que se plantea al investigar la fisiopatología de la gestación es la imposibilidad de obtener muestras de células trofoblásticas de primer trimestre dado las legislaciones vigentes en Argentina. Ocurre además, que en estas muestras las cantidades de trofoblasto primario son escasas y los cultivos suelen estar contaminados con otros tipos celulares presentes en la placenta, como los fibroblastos. Adicionalmente, las células provenientes de cultivos primarios de trofoblasto cesan rápidamente su proliferación en cultivo y su transfección es dificultosa. Por ello, la propuesta del presente proyecto es evaluar los efectos de los mediadores lipídicos sobre una línea celular obtenida a partir de trofoblasto normal de primer trimestre: las células HTR-8/SVneo. Esta línea celular fue establecida por el Dr. Charles H. Graham (Queen's University, Kingston, ON, Canada) a partir de trofoblasto humano de primer trimestre, introduciendo el antígeno T del virus SV40, sin ningún efecto sobre su cariotipo o fenotipo. Si bien son células inmortalizadas, no presentan las características de las células tumorales o metastásicas. Por esta razón, estas células pueden ser utilizadas como una importante herramienta para el estudio de las funciones del trofoblasto. Las células HTR-8/SVneo soportan más de 32 pasajes y requieren al menos un 5% de suero para mantener un crecimiento sostenido y su capacidad invasiva. Son positivas para citoqueratina 7, vimentina y HLA-G, moléculas características del trofoblasto extraveloso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Observamos que la incubación con LPA 100 mM inhibe la proliferación de las células de trofoblasto de primer trimestre ($p < 0.01$) mientras que estimula la invasión ($p < 0.05$) y la migración ($p < 0.05$) de este tipo celular. Previamente, se ha informado que el LPA es un potente mensajero de origen lipídico con diversas funciones biológicas sobre distintos tipos celulares. En modelos de desarrollo en mamíferos, el LPA estimula la maduración ovocitaria, el desarrollo de embriones de 2 y 4 células al estadio de blastocisto y el transporte embrionario en el oviducto. Nuestros resultados junto con los antecedentes informados por otros autores sugieren que el LPA modula la implantación del embrión en la cavidad uterina a través de la regulación de funciones claves

del trofoblasto diferenciado como la proliferación, la migración y la invasión.

Las células HTR-8/SVneo expresan la lisofosfolipasa D, la principal enzima involucrada en la producción de LPA, además del receptor LPA3. Hasta el momento se han descrito 6 receptores distintos para el LPA (LPA1-6) que se encuentran acoplados a diversas proteínas G. Durante la diferenciación embrionaria en murinos, los embriones expresan constitutivamente el ARNm del LPA1, mientras que el ARNm del LPA2 sólo se expresa en el estadio de blastocisto y no se detecta la expresión del LPA3 en ninguno de los estadios analizados. Los cultivos primarios de células de trofoblasto humanas de primer trimestre expresan solamente el receptor LPA1. Además, durante la gestación en humanos se ha observado que la actividad sérica de la lisofosfolipasa D aumenta conforme progresa la gestación, sugiriendo la acumulación de LPA en el tracto reproductivo. De hecho, la concentración en suero de LPA también se incrementa durante la gestación llegando a valores de 50 μ M en el primer trimestre. La placenta humana expresa la lisofosfolipasa D en los tres trimestres de embarazo predominantemente en las células del trofoblasto y la expresión de la misma se incrementa a medida que progresa la gestación. En conjunto, estos hallazgos sugieren que el trofoblasto podría ser la fuente principal de lisofosfolipasa D durante la gestación y que además sería capaz de producir LPA.

La co-incubación de las células del trofoblasto con LPA y un antagonista altamente selectivo para el receptor LPA3, el DGPP, revierte el efecto del LPA sobre la proliferación, la invasión y la migración. Si bien el DGPP revierte completamente el efecto del LPA sobre la invasión y la migración, este antagonista provoca una reversión parcial sobre la proliferación. Esto último sugiere la participación de otros receptores para el LPA, aparte del LPA3. Como ya hemos mencionado anteriormente, los cultivos primarios de trofoblasto de primer trimestre también expresan el receptor LPA1, de manera que el LPA podría estar actuando a través del LPA3 y del LPA1 sobre la proliferación de las células trofoblásticas. Otros autores han informado que los ratones deficientes en LPA1 y LPA2 tienen la capacidad de reproducirse normalmente. Sin embargo, las hembras LPA3^{-/-} presentan un retraso en el día de la implantación y aberraciones en el espaciamiento entre los embriones. En este sentido, cabe mencionar que el receptor LPA3 se encuentra expresado en el endometrio de mujeres fértiles durante todo el ciclo menstrual, siendo su expresión significativamente menor en el endometrio proveniente de

mujeres con fallas repetidas en la implantación. En nuestro laboratorio observamos además que la administración intra-uterina de DGPP a ratas preñadas produce fallas en la decidualización y la vascularización de los sitios de implantación. En conjunto estas observaciones sugieren la importancia de la regulación del receptor LPA3 durante la etapa implantatoria tanto en la cara materna como en la fetal de la interfase materno-fetal.

Cuando analizamos la participación de las PGs en el efecto del LPA, observamos que la co-incubación con un inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2 (meloxicam) revierte completamente el efecto inhibitorio del LPA sobre la proliferación celular sin modificar la estimulación sobre la migración y la invasión. Además describimos la localización celular de ambas isoformas de la ciclooxigenasa en las células HTR-8/SVneo. Estos resultados sugieren que las prostaglandinas derivadas de la actividad de la ciclooxigenasa-2 median el efecto del LPA sobre la proliferación de las células trofoblásticas durante el primer trimestre de gestación. De hecho, el LPA estimula la producción de las PGE2 y PGF2alfa. Se ha informado que estas prostaglandinas en particular son importantes mediadoras de la reacción de decidualización y de la neovascularización que tiene lugar en los sitios de implantación.

Al investigar la participación del sistema endocannabinoide observamos que el tratamiento con antagonistas selectivos de los receptores de cannabinoides CB1 y CB2 revierte completamente el efecto del LPA sobre la proliferación sin alterar la respuesta ejercida sobre la migración y la invasión de las células de trofoblasto de primer trimestre. Diferentes autores han demostrado que los endocannabinoides tienen relevancia fisiopatológica en la comunicación que se establece entre el embrión y el endometrio materno durante el proceso de implantación. La expresión de la FAAH (hidrolasa de amidas de ácidos grasos), la enzima que degrada la AEA, en células mononucleares de sangre periférica es menor en mujeres con abortos espontáneos, comparada con aquellas que tuvieron embarazos exitosos. En este sentido, los niveles circulantes y la actividad de la FAAH se encuentran disminuidos en pacientes que no lograron un embarazo a término luego de un tratamiento de fecundación asistida. Por último, cabe mencionar que niveles elevados de AEA plasmática se correlacionan con fallas en el embarazo y con la ocurrencia de abortos tempranos en mujeres gestantes. Se ha descrito la presencia de los receptores CB1 y CB2 en células trofoblásticas de primer trimestre. En particular en nuestro laboratorio observamos que las células HTR-8/SVneo

expresan estos receptores. Se ha informado que la activación del receptor CB1 promueve la apoptosis de células deciduales humanas y que altas concentraciones de AEA inhiben el crecimiento de células de trofoblasto de primer trimestre a través de los receptores CB2.

Hasta ahora los tratamientos que se emplean para la prevención de las pérdidas tempranas del embarazo por fallas en la implantación están basados en el mejoramiento de la funcionalidad del endometrio. Pensamos que los resultados obtenidos en este trabajo junto con investigaciones a futuro brindarán un nuevo enfoque terapéutico para el tratamiento de las fallas en la implantación y permitirán el desarrollo de herramientas farmacológicas novedosas. En base a los resultados obtenidos, postulamos que el LPA funcionaría como un modulador de la proliferación de las células del trofoblasto de primer trimestre, modulando la capacidad de migrar y de invadir de estas células. De esta manera, el LPA tendría un rol pro-implantatorio, en el sentido que permitirá que el trofoblasto migre e invada en forma controlada la matriz uterina. En este sentido, tanto las prostaglandinas como los endocannabinoides parecen ser parte del sistema de regulación que ejerce el LPA sobre el trofoblasto, modulando por lo tanto al menos en forma indirecta las principales funciones que cumple el trofoblasto durante la implantación.

ABSTRACT

Bioactive lipid molecules as lysophosphatidic acid (LPA), prostaglandins (PG) and endocannabinoids are important mediators of embryo implantation. Based on previous published data we became interested in studying the interaction between these three groups of lipid derivatives in crucial trophoblast functions: proliferation, migration and invasion. Thus, we adopted a pharmacological approach in vitro using LPA, DGPP (a highly selective antagonist of LPA₃, an LPA receptor), endocannabinoids' receptor selective antagonists (AM251 and AM630) and non selective (indomethacin) and selective (meloxicam) inhibitors of cyclooxygenase-1 and 2 enzymes. Cyclooxygenase isoforms participate in prostaglandins' synthesis. The incubation of the trophoblast cells (HTR-8/SVneo) with LPA 100 mM inhibited trophoblast proliferation and increased the invasion and migration of these cells. Also, LPA increased PGE₂ and PGF₂α production. The trophoblast cells expressed both cyclooxygenase-1 and 2 enzymes. The incubation of LPA with indomethacin

or meloxicam reversed the inhibition in proliferation, suggesting that cyclooxygenase-2 was the isoform involved in LPA effect. PGs are important mediators of decidualization and vascularization at the implantation sites. Proliferation, migration and invasion were mediated by LPA3, as the incubation with DGPP completely reversed LPA actions. Besides, we also observed that endocannabinoids mediated the inhibitory effect of LPA on proliferation, as the incubation of LPA with AM251 or AM630 completely reversed LPA effect. Overall, the results presented here demonstrate the participation of LPA3 in proliferation, migration and invasion of the trophoblast, through the interaction with other groups of lipid molecules, prostaglandins and endocannabinoids, which prepare the maternal-fetal interphase for embryo invasion during the window of implantation.

MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LOS PROCESOS DE ACTIVACIÓN Y APOPTOSIS DE PMN INDUCIDA POR AISLADOS CLÍNICOS DE *MTB* PREVALENTES EN NUESTRO PAÍS

Bqca. María Mercedes Romero
IMEX-CONICET, Academia Nacional de Medicina

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad crónica cuyo agente infeccioso es el *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 (CD) 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 CD 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).

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 [3], como así también la producción de citoquinas inflamatorias que contribuyen al reclutamiento de leucocitos al sitio de infección. La activación de los 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 [4].

A nivel global se han definido seis linajes filogenéticamente distintos con fuertes asociaciones con su origen geográfico, a saber: Euro-americano, Asiá-

tico del este, Indo-Oceánico, Africano-Este, Africano-Oeste 1 y Africano-Oeste 2^[5]. En nuestro país, el linaje prevalente es el Euro-Americano que comprende diferentes familias: Haarlem, Latino-Americano-Mediterráneo (LAM), familia X (Europea IS6110 de bajas bandas), familia S y familia T [6, 7, 8]. La técnica de RFLP basada en la secuencia de inserción IS6110, ha permitido identificar cepas de amplia diseminación, cepas responsables de brotes o aquellas que causaron casos únicos de TB. El brote más importante en nuestro país fue el comunicado por el Hospital Muñiz de Buenos Aires, donde se aisló una cepa resistente a 5 o más drogas, la que fue denominada cepa M de la familia Haarlem, siendo posteriormente comunicada en otros centros de salud del área metropolitana. Otros brotes de menor magnitud asociados a SIDA tuvieron lugar en algunos hospitales de la Ciudad de Buenos Aires (cepa C) y en el hospital Carrasco de la Ciudad de Rosario (cepas Ra, Rb, Rc) [9, 10, 11]. Más de una década después, estos brotes aún no han sido controlados.

En los últimos años se han podido identificar varios genes involucrados en la virulencia y la patogenicidad del *Mtb* [12]. 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 de la familia Haarlem [13]. Es conocida la importancia que las variaciones genéticas tienen para la formulación de vacunas protectoras [14] por lo tanto, para lograr este objetivo es importante determinar la respuesta inmune inducida por los linajes autóctonos y su interacción con el huésped.

Previamente caracterizamos el efecto de la cepa de referencia H37Rv sobre los PMN, demostrando que induce activación a bajas relaciones *Mtb*:PMN y que además, acelera la muerte por apoptosis *in vitro* 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* [16]. 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. Siguiendo esta línea de trabajo, iniciamos el estudio de los aislados clínicos de *Mtb* prevalentes en el país sobre la respuesta en PMN y la comparamos con la cepa de referencia. Observamos que la cepa LAM (familia LAM) tiene mayor capacidad de activación sobre el PMN que el resto de los aislados clínicos y una mayor capacidad de inducir apoptosis. Más aun, la cepa M no induce apoptosis y es poco activadora del PMN.

En base a estos antecedentes, el **objetivo** de este proyecto fue dilucidar los mecanismos implicados en los procesos de activación y apoptosis en PMN inducidos por los distintos aislados clínicos de *Mtb*, que nos permitan explicar las diferencias observadas a nivel de la respuesta inmune innata.

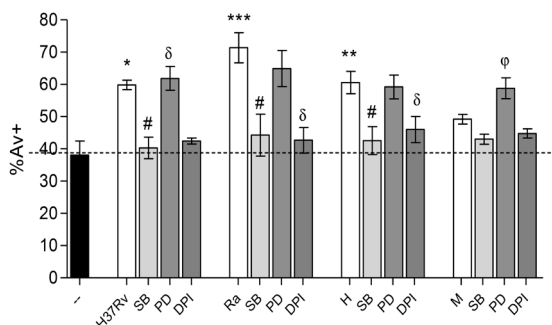
RESULTADOS

Con el objetivo de estudiar los mecanismos que subyacen al proceso apoptótico inducido por *Mtb*, los PMN se incubaron con inhibidores específicos y se enfrentaron durante 18 horas con los aislados clínicos LAM, H y M, evaluándose luego la apoptosis por marcación con Anexina V/Ioduro de Propidio (Av/Pi). Tal como muestra la Figura 1.A, el inhibidor específico de p38 (SB203580) redujo significativamente la apoptosis inducida por los aislados Ra y H, lo que coincidió con los resultados obtenidos previamente con la cepa de referencia H37Rv [15]. Evaluamos también la participación de ROS empleando un inhibidor de oxidasas (DPI), dado que estos participan en la regulación de la apoptosis dependiente de p38 [17]. Observamos entonces que los ROS participan en la inducción de la apoptosis de los PMN por todos los aislados clínicos (Figura 1A). Cabe destacar que cuando ERK, una MAPK que tiene efecto anti-apoptótico en el PMN [18], fue inhibida con PD98059 ahora si, M fue capaz de inducir la apoptosis. Esto sugiere que M, podría estar disparando un mecanismo anti-apoptótico que “encubriría” el efecto apoptótico esperado de la bacteria.

En coincidencia con estos resultados, observamos que en el proceso de activación medido por CD11b, todos los aislados clínicos involucran p38, salvo la cepa M que además involucraría ERK (Figura 1B). Los ROS en cambio no participarían en este proceso.

Con el fin de evaluar el grado de participación de la mencionada señal anti-apoptótica disparada por M, se añadió al cultivo el intermediario superóxido (H_2O_2) antes del estímulo con los distintos aislados clínicos y se evaluó la apoptosis mediante marcación con AV/Pi. Se observó que la apoptosis inducida por todas las cepas fue mayor en presencia de H_2O_2 . Sin embargo, este efecto fue menor para las cepas Haarlem, en particular para la cepa M, cuyo efecto no fue suficiente para alcanzar altos niveles de apoptosis (Figura 2). Esto apoya la idea de que ciertos mecanismos anti-apoptóticos protectivos disparados por M, podrían estar implicados.

A)



B)

tratamiento ^a / aislado clínico	--	H37Rv	Ra	H	M
--	729±107	1300±137*	1529±115*	1234±115*#	992±95*#f
+SB	720±100	805±126	950±120	764±87	574±85
+PD	730±110	1303±176*	1480±160*	1148±132*	722±62
+DPI	770±105	1334±328*	1442±200*	1363±262*	963±120*

Figura 1. Los PMN se aislaron por centrifugación con Ficoll-Hipaque y sedimentación con dextrán 6%, removiéndose los glóbulos rojos residuales por lisis hipotónica. A) Los PMN se enfrentaron en una relación 1:2 *Mtb*:PMN con los aislados clínicos de *Mtb* y la cepa de referencia H37Rv durante 18 h en presencia o no de inhibidores específicos de p-p38 (SB), p-ERK (PD) y de ROS (DPI), y se determinó la apoptosis por marcación con AV/Pi, detectándose por citometría de flujo. Control (--) vs. Ra: ***p<0.001, control vs. H: **p<0.01, control vs. H37Rv: *p<0.05; H37Rv, Ra y H vs. SB: #p<0.01; H37Rv, Ra y H vs. DPI: δp<0.001; M vs. PD: φp<0.01. B) Los PMN se enfrentaron en una relación 1:2 *Mtb*:PMN durante 3 h con los aislados clínicos de *Mtb* y la cepa de referencia H37Rv en presencia o no de inhibidores de p-p38 (SB), p-ERK (PD) y de ROS (DPI), midiéndose luego la expresión de CD11b por citometría de flujo como medida de activación.

*p<0.02 comparado con el control (--).

p<0.005 comparado con H37Rv y LAM

f p<0.03 comparado con H

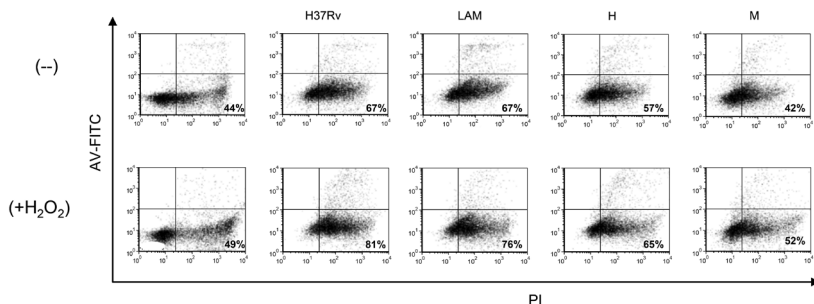


Figura 2. Los PMN se incubaron en presencia o no de H₂O₂ (10 mM) durante 15 min. Luego los PMN se cultivaron en una relación *Mtb*:PMN 1:2 durante 18 h con los aislados clínicos de *Mtb* y la cepa de referencia H37Rv. La apoptosis se determinó por marcación con AV/Pi. Ejemplo representativo de 5 realizados.

Dada la importancia de p38 y los ROS en el proceso de apoptosis en los PMN disparado por *Mtb*, evaluamos posibles diferencias en cuanto a la inducción de estos intermediarios por los distintos aislados clínicos. Como se observa en la Figura 3A y 3B todos los aislados clínicos activan p38 y generan ROS de forma significativa, salvo el aislado M.

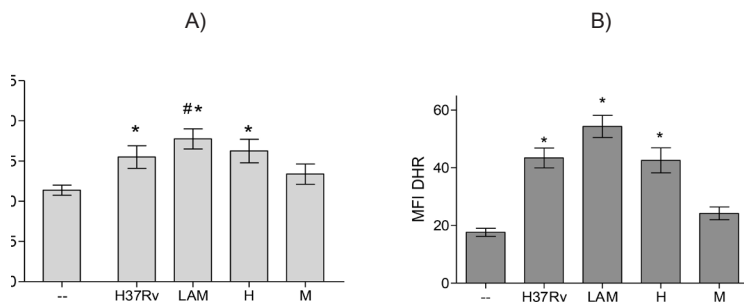


Figura 3. A) Los PMN se enfrentaron en una relación 1:2 *Mtb*:PMN durante 60 min. con los diferentes aislados clínicos. Se determinó la activación de la forma activa de p38 (p-p38) mediante marcación intra-citoplasmática con un anticuerpo específico marcado con FITC, detectándose por citometría de flujo. B) Los PMN se incubaron con 50 μ l de 123- Dihidrorodamina (DHR) (5 μ g/ml) durante 15 min. a 37° C. Luego los PMN se enfrentaron con los distintos aislados clínicos de *Mtb* en una relación 1:2 *Mtb*:PMN durante 90 min. adicionales. La oxidación de la DHR se detectó por citometría de flujo en el canal FL-1. Control (--) vs. H37Rv, LAM y H: *p<0.05; LAM vs. H37Rv, H y M: #p<0.05.

Ha sido documentada la participación de ciertos genes bacterianos anti-apoptóticos que codifican para NADH dehidrogenasa como así también superóxido dismutasa A (SodA), secretada por *Mtb* que participa en la inhibición de la apoptosis [19]. En este contexto decidimos estudiar la existencia de elementos estructurales y/o metabólicos en los aislados clínicos, en particular en el aislado M que pudieran estar afectando la interacción con el PMN. Por ello, realizamos la determinación de la generación de ROS, utilizando bacterias muertas por calor, de manera de anular el metabolismo bacteriano, el cual podría estar aun presente en la bacteria irradiada. Como muestra la Figura 4, cuando M es inactivada por calor, no es capaz de inducir ROS al igual que la cepa gamma irradiada, pudiendo así descartar la presencia de estas enzimas con acción anti-apoptótica. Por otra parte, tanto LAM como H37Rv pierden toda su capacidad de inducir el estallido respiratorio, quedando así demostrado que la estructura intacta de la bacteria es necesaria para generar una respuesta en el PMN.

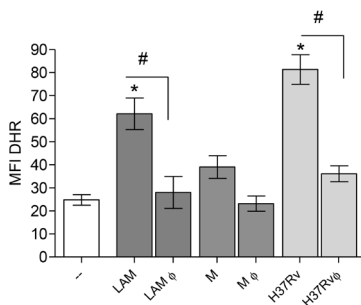


Figura 4. Los PMN se incubaron con DHR (5µg/ml) durante 15 min. a 37° C. Luego los PMN se cultivaron a relación 1:2 *Mtb*:PMN durante 90 min. con los aislados clínicos de *Mtb* o la cepa de referencia H37Rv gamma irradiados o muertos por calor (*Mtb*Ø). La oxidación de la DHR a Rodamina se detectó por citometría de flujo en el canal FL-1. Control (-) vs. LAM y H37Rv: *p<0.05; LAM vs. LAMØ, y H37Rv vs. H37RvØ: #p<0.05.

La apoptosis inducida por H37Rv en los PMN es mediada por la activación de la vía TLR2/p38 MAPK [15]. Se ha publicado recientemente que en MØ, la producción de ROS inducida por hongos involucra dectin-1, un receptor que reconoce los β-glucanos de la pared fúngica. La probable interacción de la micobacteria con dectin-1 resulta inesperada debido a que los

β -glucanos, han sido descriptos previamente en bacterias como *Brucella*, *Agrobacterium* y *Rhizobium* [20, 21], pero no en *Mycobacterium* sp. Si bien se ha demostrado recientemente que TLR2 y dectin-1 trabajan en conjunto para promover la activación de los M ϕ en la infección por micobacterias [22], la importancia de este receptor en la infección por *Mtb* no ha sido aun claramente dilucidada. Siguiendo esta línea, y dada la participación de los ROS en la apoptosis inducida por *Mtb*, evaluamos el rol de TLR2 y dectin-1 en la generación de ROS en PMN estimulados con LAM. Además, estudiamos la participación de CD11b ya que este receptor promueve la fagocitosis sin la generación de estallido respiratorio [23].

Los resultados muestran que tanto TLR2 como dectin-1 participarían en este evento ya que la generación de ROS por el aislado LAM disminuye frente al bloqueo de ambos receptores. Cabe destacar que el bloqueo de cada receptor por separado reduce los niveles de ROS a los valores del control, lo cual puede indicar una participación conjunta de ambos receptores para disparar la señalización.

Por otro lado el bloqueo de CD11b no afectó significativamente la producción de ROS, evidenciando que este mecanismo es independiente de esta molécula.

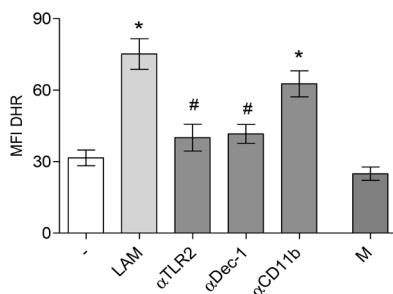


Figura 5. Los PMN se incubaron con DHR (5 μ g/ml) durante 15 min. a 37° C y luego se cultivaron en presencia o no de anticuerpos neutralizantes anti-TLR2, anti-dectin-1 o anti-CD11b durante 20 min. a temperatura ambiente enfrentándolos luego a los aislados clínicos de *Mtb* durante 90 min. adicionales. La oxidación de la DHR a Rodamina se detectó por citometría de flujo en el canal FL-1. Control (--) vs. LAM y α CD11b: * p <0.05; LAM vs. α TLR2 y α dectin-1: # p <0.05

CONCLUSIONES

En este trabajo estudiamos los mecanismos involucrados en la apoptosis y activación de los PMN inducidos por los aislados clínicos de *Mtb* prevalentes en nuestro país. Demostramos que la apoptosis es mediada por la activación de p38 y los ROS mediante la interacción con el TLR2 y dectin-1 en la membrana del PMN. De hecho, la falta de inducción de apoptosis por el aislado M se debe a la falla en la generación de ROS y a mecanismos anti-apoptóticos mediados por ERK. El hecho de que todos los aislados clínicos involucren a p38 en la up regulación del CD11b pero M involucre además ERK, confirma que los aislados clínicos podrían disparar diferentes vías de señalización.

Estos resultados confirman que existen diferencias en cuanto a la respuesta inmune inducida entre los aislados clínicos de *Mtb* debido quizás a variaciones estructurales de la pared bacteriana. Podríamos considerar dichas variaciones, como una estrategia de evasión de la micobacteria en la medida que evitan o minimizan el reconocimiento por el sistema inmune (receptores de reconocimiento de patrones) del huésped.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a chronic disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). The PMN is a key component in the first line of defense against pathogens such as *Mtb*, since the flow of these cells into the lungs is one of the earliest events in the pathogenesis of TB. In our country, the prevalent lineage of *Mtb* is the Euro-American, comprising different families: Haarlem, Latin-American-Mediterranean (LAM) X family (low IS6110 European bands), S family and T family. In recent years there have been identified several genes involved in virulence and pathogenicity of *Mtb*. Slight variations in these genes, can determine large phenotypic differences, conditioning *Mtb* recognition by immune system cells.

In previous works we observed that the LAM strain (LAM family) has a greater capacity of the PMN activation and increased ability to induce PMN apoptosis than clinical isolates of family Haarlem. Moreover, the M strain (Haarlem family) does not induce apoptosis and show little PMN activation.

The aim of this study was to elucidate the mechanisms involved in the processes of PMN activation and apoptosis induced by *Mtb* clinical isolates

most successful in Argentina belonging to LAM and Haarlem families, that allow us to explain the differences observed at the level of PMN response. We observed that LAM clinical isolate (LAM family) induces PMN apoptosis mediated by the generation of ROS through TLR2 and dectin-1, and p38 activation. Contrary Haarlem family, particularly the isolated M does not induce apoptosis due to lack of production of ROS and a null p38 activation. Moreover, anti-apoptotic mechanisms mediated by ERK, were involved. Also, we rule out the possible existence of enzymes with anti-apoptotic action. These results suggest that differences in the PMN response induced by clinical isolates of *Mtb* could be explained by structural differences of the bacterial wall, conditioning subsequent interaction and response of the target cell. We could consider such variations, as an evasion strategy that avoid or minimize the recognition by the host immune system.

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR HEPÁTICO MRP3 (ABCC3) POR ETINILESTRADIOL. IMPLICANCIAS EN LA TERAPÉUTICA CON ESTRÓGENOS.

Ruiz ML, Rigalli JP, Arias A, Villanueva SSM, Banchio C, Vore M, Mottino
AD y Catania VA.

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET).

SÍNTESIS DEL INFORME FINAL:

La proteína asociada a resistencia a multidrogas 3 (MRP3/Mrp3) es un transportador basolateral que bombea sustratos aniónicos tales como sales biliares sulfatadas, glucuronidos de bilirrubina, 17 β -glucuronosil estradiol, algunas drogas anticancerígenas, etc. (1, 2). En condiciones normales estos sustratos son preferencialmente excretados al canalículo biliar vía Mrp2 (transportador apical). Se ha demostrado que Mrp3 se encuentra marcadamente inducida en situaciones donde existe una disminución de Mrp2 (obstrucción del conducto biliar en ratas (3, 4), en animales naturalmente deficientes en Mrp2 (5, 6) y en pacientes con síndrome de Dubin-Johnson (2) o con cirrosis biliar primaria). Estos hallazgos sugieren que MRP3/Mrp3 funciona extruyendo bilirrubina y sales biliares conjugadas desde el hepatocito hacia la sangre cuando la secreción biliar se encuentra afectada. Estudios recientes en ratones *knock out* para Mrp3 con el conducto biliar ligado le adjudican un rol a esta proteína para la extrusión de conjugados con ácido glucurónico endógenos (7). Sin embargo, al presente, los mecanismos moleculares que regulan la expresión de MRP3/Mrp3 han sido poco estudiados. Los estrógenos están involucrados en la patogénesis de la colestasis inducida por anticonceptivos orales y en la colestasis del embarazo. Se ha demostrado que el estrógeno sintético etinilestradiol (EE), reduce el flujo biliar (FB) en animales de experimentación. En la rata, las alteraciones en el FB por EE se han asociado a una disminución en la actividad y expresión de Mrp2, entre otros factores. La expresión del transportador canalicular Mrp2 se encuentra disminuida post-transcripcionalmente (8, 9). En trabajos previos hemos demostrado que Mrp3 está inducida en hígado de ratas con colestasis producida por EE (10, 11). Recientemente demostramos que EE estaría ejerciendo una acción directa sobre el gen de Mrp3 de rata, independientemente de la

colestasis (12) aunque aun se desconoce el mecanismo molecular implicado.

Las acciones fisiológicas de los estrógenos son mediadas por el receptor de estrógenos (ER)- α y β , los cuales pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares de esteroides (13, 14). Luego de ser activado por un ligando, el ER intracelular sufre un cambio conformacional y homodimeriza, regulando así sus genes diana. El modelo clásico de regulación de genes por el ER involucra la unión directa del dímero de ER a secuencias de ADN conocidas como elementos de respuesta a estrógenos (ERE), las cuales son secuencias palindrómicas invertidas específicas. Además el ER puede asociarse indirectamente con regiones promotoras a través de interacciones proteína-proteína con otros factores de transcripción como la proteína de especificidad 1 (Sp1) o la proteína activadora-1 (AP-1), complejo formado por homodímeros de c-JUN o heterodímeros de c-JUN/c-FOS (15). En cualquiera de estos casos, la interacción del ER con estrógenos resulta en la activación transcripcional de genes vía reclutamiento de co-activadores y componentes de la maquinaria transcripcional basal. El hígado expresa predominantemente ER- α y su expresión se encuentra bajo regulación multihormonal (16). Al usar ratones *knock out* para ER- α , Yamamoto y col. (17) demostraron que el ER- α media la represión de transportadores hepáticos y la alteración de la biosíntesis de ácidos biliares, contribuyendo al desarrollo de la hepatotoxicidad inducida por EE. Hasta el presente no se conoce el efecto de los estrógenos sobre la expresión de MRP3 humana. Dado que la interacción de receptores nucleares con ligandos selectivos puede variar entre especies y considerando las diferencias que existen entre el promotor de *mrp3* de rata y humano (18, 19), evaluamos si EE es también capaz de inducir MRP3 en células HepG2 cells, una línea celular de hepatoma humano, y si ER- α está implicado.

Como resultado se obtuvo lo siguiente: al incubar las células HepG2 a distintos tiempos y concentraciones de EE no se observaron variaciones en los niveles proteicos de MRP3, detectada por *Western blotting*. Luego se transfectaron las células con un vector de expresión para ER- α humano y se comprobaron la expresión (por *Western blotting*) y la actividad (utilizando gen reportero) del ER- α transfectado. Al tratar estas células con EE se observó un aumento en los niveles proteicos (por *Western blotting*) y de ARN mensajero (por *Real time PCR*) de MRP3 a las 48 hs de incubación con EE 50 μ M. ER- α activado por ligando puede regular la expresión génica uniéndose a sitios ERE (estrogen response elements) en el promotor del gen diana (vía clásica) o indirectamente a través de interaccionar con factores de transcripción como AP-1 o Sp-1 (vía no clásica o alternativa). El análisis *in silico* de la región pro-

motora de MRP3 no mostró presencia de sitios ERE y pero si mostró presencia de sitios de unión a AP-1. Por lo tanto se decidió evaluar la participación potencial de estos factores de transcripción en la inducción de MRP3 por EE. Para ello se cuantificaron por *Western blotting* los niveles proteicos de c-JUN y c-FOS (ambos miembros importantes de la familia AP-1). Se encontraron niveles de c-JUN incrementados en las células HepG2 transfectadas con ER- α e incubadas con EE (50 μ M por 48 hs) no así los niveles de c-FOS que permanecieron sin cambios. Luego, para explorar si la inducción de c-JUN podría ser un mediador de la inducción de MRP3, se analizó el efecto de la sobre-expresión de c-JUN sobre los niveles de MRP3. Las células HepG2 se co-transfectaron con el ADNc codificante para c-JUN y para ER- α o sus respectivos vectores vacíos. La sobre-expresión de c-JUN en células transfectadas con ER- α condujo a la inducción de MRP3, aun en ausencia de EE, y en una magnitud similar a aquélla producida por el tratamiento con EE en células transfectadas sólo con ER- α . Además que el tratamiento con EE de células que sobre-expresan c-JUN no produjo una mayor inducción de MRP3 cuando se compararon estas mismas células incubadas con el vehículo. Las células HepG2 que no expresan el ER- α no mostraron modificaciones en los niveles de MRP3 en respuesta a la transfección con c-JUN. A modo de confirmar que la modulación de c-JUN está involucrada en la inducción de MRP3 por EE, se realizó el *knock-down* de c-JUN por la técnica de ARN de interferencia y se evaluó el efecto de EE sobre la expresión de MRP3. Observamos que el *knock-down* de c-JUN evitó cualquier inducción de MRP3 por EE. Por el contrario, el tratamiento con EE de las células controles (transfectadas con ARN de interferencia no silenciante, control) resultó en un aumento de MRP3. Esta inducción fue similar a aquélla observada en células no transfectadas con ARN de interferencia para c-JUN. Nuestros resultados sugieren que la presencia de ER- α y la inducción de c-JUN son necesarias para que EE produzca la inducción de la expresión de MRP3. Dado que ambas acciones se necesitan al mismo tiempo, continuamos estudiando si el tratamiento con EE promueve la interacción ER- α /AP-1. A través de ensayos de co-inmuno-precipitación observamos que EE (50 μ M 48 hs) aumenta la formación del complejo ER- α /AP-1. Además mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) demostramos que EE induce el reclutamiento de este complejo a un sitio de unión AP-1 localizado en la región promotora de *mrp3*.

Varios estudios diferentes implican a AP-1 como un mediador clave en inducir la expresión de *Mrp3*/MRP3. La actividad transcripcional de AP-1 está aumentada un 300% en células HepG2 luego de la exposición de estas célu-

las a ácido taurolitocólico (20), y podría explicar los hallazgos de Teng et al. (21) demostrando que el ácido taurolitocólico aumentó el ARN mensajero de MRP3 en células HepG2 y en la línea celular de hematoma humano HuH7. La ligadura de colédoco en ratones aumentó la actividad de unión de AP-1 en hígado (22), lo que podría estar ligado a estudios que demuestran que Mrp3 se induce en el hígado de ratas con ligadura de colédoco (3). El hígado de ratones tratados con lipopolisacárido mostró un aumento en la actividad de unión de AP-1 detectada por ensayos de retardo en gel (23), mientras que estudios independientes describen una inducción de Mrp3 luego de un tratamiento similar en ratas (24, 25). Se ha reportado que la unión de c-JUN a secuencias EpRE (ectrophile responsive elements) aumentó luego de la exposición de células HepG2 a 4-hidroxi-2-nonenal (26), y al mismo tiempo produce una inducción marcada de MRP3 en células NSCLC (27). Se necesitan experimentos apropiados para establecer si la activación de AP-1 y la inducción de Mrp3/MRP3 están casual o causalmente relacionadas bajo condiciones diferentes del tratamiento con EE. Se demostró que la inducción de MRP3/Mrp3 es una respuesta adaptativa para lidiar con la toxicidad hepática de metabolitos endógenos nocivos, xenobióticos y drogas, tanto bajo condiciones de colestasis u otras situaciones en ausencia de colestasis (28, 29). Proponemos que la activación de AP-1, es un participante significativo en esta respuesta adaptativa.

En conclusión, los datos presentes demuestran por primera vez que EE induce MRP3 en células HepG2 vía ER- α a través de la vía no clásica mediada por AP-1.

ABSTRACT

Previously, we have demonstrated that 17 α -ethynylestradiol (EE) induces rat multidrug-resistance associated protein 3 (Mrp3, Abcc3) expression transcriptionally through estrogen receptor- α (ER- α) activation. We explored the effect of EE on MRP3 expression of human origin. HepG2 cells were transfected with ER- α and incubated with EE (1-10-50 μ M) for 48 h. MRP3 protein and mRNA levels were measured by *Western blotting* and *Real time* PCR, respectively. EE up-regulated MRP3 protein and mRNA at 50 μ M only in ER- α (+)-HepG2 cells. The *in silico* analysis of *mrp3* promoter region demonstrated absence of estrogen response elements, but showed several AP-1 binding sites. We further evaluated the potential involvement of the transcrip-

tion factors c-JUN and c-FOS (members of AP-1) in MRP3 up-regulation. ER- α (+) HepG2 cells were incubated with EE and c-FOS and c-JUN levels measured by *Western blotting* in nuclear extracts. EE up-regulated only c-JUN. Experiments of overexpression and *knock-down* of c-JUN by siRNA further demonstrated that this transcription factor is indeed implicated in MRP3 up-regulation by EE. Co-immunoprecipitation assay demonstrated that EE induces c-JUN/ER- α interaction, and chromatin immunoprecipitation assay showed that this complex is recruited to the AP-1 binding consensus element present at the position (-1300/-1078bp) of human *mrp3* promoter. We conclude that EE induces MRP3 expression through ER- α , with recruitment of ER- α in complex with c-JUN to the human *mrp3* promoter.

REFERENCIAS

1. König, J., Nies, A.T., Cui, Y., Leier, I. & Keppler, D. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1461, 377-394 (1999).
2. König, J., Rost, D., Cui, Y. & Keppler, D. Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* 29, 1156-1163 (1999).
3. Donner, M.G. & Keppler, D. Up-regulation of basolateral multidrug resistance protein 3 (Mrp3) in cholestatic rat liver. *Hepatology* 34, 351-359 (2001).
4. Soroka, C.J., Lee, J.M., Azzaroli, F. & Boyer, J.L. Cellular localization and up-regulation of multidrug resistance-associated protein 3 in hepatocytes and cholangiocytes during obstructive cholestasis in rat liver. *Hepatology* 33, 783-791 (2001).
5. Hirohashi, T. et al. Hepatic expression of multidrug resistance-associated protein-like proteins maintained in eisai hyperbilirubinemic rats. *Mol Pharmacol* 53, 1068-1075 (1998).
6. Johnson, B.M., Zhang, P., Schuetz, J.D. & Brouwer, K.L. Characterization of transport protein expression in multidrug resistance-associated protein (Mrp) 2-deficient rats. *Drug Metab Dispos* 34, 556-562 (2006).
7. Belinsky, M.G. et al. Analysis of the in vivo functions of Mrp3. *Mol Pharmacol* 68, 160-168 (2005).
8. Lee, J. & Boyer, J.L. Molecular alterations in hepatocyte transport mech-

- anisms in acquired cholestatic liver disorders. *Semin Liver Dis* 20, 373-384 (2000).
9. Trauner, M. et al. The rat canalicular conjugate export pump (Mrp2) is down-regulated in intrahepatic and obstructive cholestasis. *Gastroenterology* 113, 255-264 (1997).
 10. Ruiz, M.L., Villanueva, S.S., Luquita, M.G., Ikushiro, S., Mottino, A.D. & Catania, V.A. Beneficial effect of spironolactone administration on ethynylestradiol-induced cholestasis in the rat: involvement of up-regulation of multidrug resistance-associated protein 2. *Drug Metab Dispos* 35, 2060-2066 (2007).
 11. Ruiz, M.L., Villanueva, S.S., Luquita, M.G., Vore, M., Mottino, A.D. & Catania, V.A. Ethynylestradiol increases expression and activity of rat liver MRP3. *Drug Metab Dispos* 34, 1030-1034 (2006).
 12. Ruiz, M.L. et al. Induction of hepatic multidrug resistance-associated protein 3 by ethynylestradiol is independent of cholestasis and mediated by estrogen receptor. *Drug Metab Dispos* 41, 275-280 (2013).
 13. Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S. & Gustafsson, J.A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5925-5930 (1996).
 14. Mosselman, S., Polman, J. & Dijkema, R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392, 49-53 (1996).
 15. Marino, M., Galluzzo, P. & Ascenzi, P. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics* 7, 497-508 (2006).
 16. Alvaro, D. et al. Estrogens stimulate proliferation of intrahepatic biliary epithelium in rats. *Gastroenterology* 119, 1681-1691 (2000).
 17. Yamamoto, Y. et al. Estrogen receptor alpha mediates 17alpha-ethynylestradiol causing hepatotoxicity. *J Biol Chem* 281, 16625-16631 (2006).
 18. Bohan, A., Chen, W.S., Denson, L.A., Held, M.A. & Boyer, J.L. Tumor necrosis factor alpha-dependent up-regulation of Lrh-1 and Mrp3 (Abcc3) reduces liver injury in obstructive cholestasis. *J Biol Chem* 278, 36688-36698 (2003).
 19. Tzeng, S.J., Chang, W.C. & Huang, J.D. Transcriptional regulation of the rat Mrp3 gene promoter by the specificity protein (Sp) family members and CCAAT/enhancer binding proteins. *J Biomed Sci* 12, 741-761 (2005).
 20. Pusl, T., Vennegeerts, T., Wimmer, R., Denk, G.U., Beuers, U. & Rust, C. Tauroursodeoxycholic acid reduces bile acid-induced apoptosis by modulation of AP-1. *Biochem Biophys Res Commun* 367, 208-212 (2008).

21. Teng, S., Jekerle, V. & Piquette-Miller, M. Induction of ABCC3 (MRP3) by pregnane X receptor activators. *Drug Metab Dispos* 31, 1296-1299 (2003).
22. Bird, M.A., Lange, P.A., Schrum, L.W., Grisham, J.W., Rippe, R.A. & Behrns, K.E. Cholestasis induces murine hepatocyte apoptosis and DNA synthesis with preservation of the immediate-early gene response. *Surgery* 131, 556-563 (2002).
23. Trauner, M., Arrese, M., Lee, H., Boyer, J.L. & Karpen, S.J. Endotoxin downregulates rat hepatic ntcp gene expression via decreased activity of critical transcription factors. *J Clin Invest* 101, 2092-2100 (1998).
24. Cherrington, N.J., Slitt, A.L., Li, N. & Klaassen, C.D. Lipopolysaccharide-mediated regulation of hepatic transporter mRNA levels in rats. *Drug Metab Dispos* 32, 734-741 (2004).
25. Donner, M.G., Warskulat, U., Saha, N. & Haussinger, D. Enhanced expression of basolateral multidrug resistance protein isoforms Mrp3 and Mrp5 in rat liver by LPS. *Biol Chem* 385, 331-339 (2004).
26. Levy, S., Jaiswal, A.K. & Forman, H.J. The role of c-Jun phosphorylation in EpRE activation of phase II genes. *Free Radic Biol Med* 47, 1172-1179 (2009).
27. Mahaffey, C.M., Zhang, H., Rinna, A., Holland, W., Mack, P.C. & Forman, H.J. Multidrug-resistant protein-3 gene regulation by the transcription factor Nrf2 in human bronchial epithelial and non-small-cell lung carcinoma. *Free Radic Biol Med* 46, 1650-1657 (2009).
28. Ghanem, C.I. et al. Shift from biliary to urinary elimination of acetaminophen-glucuronide in acetaminophen-pretreated rats. *J Pharmacol Exp Ther* 315, 987-995 (2005).
29. Villanueva, S.S. et al. Hepatic and extrahepatic synthesis and disposition of dinitrophenyl-S-glutathione in bile duct-ligated rats. *Drug Metab Dispos* 34, 1301-1309 (2006).

EFFECTO DE LA HIPERSECRECIÓN CRÓNICA DE LA HORMONA GONADOTROFINA CORIÓNICA HUMANA SOBRE EL METABOLISMO GLUCÍDICO Y LIPÍDICO: ESTUDIO EN UN MODELO DE RATONES TRANSGÉNICOS.

Guillermina Stevens, Susana B. Rulli.
Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET

INTRODUCCIÓN:

En la actualidad, el Síndrome Metabólico representa un desafío en la Salud Pública, tanto a nivel diagnóstico como su tratamiento. La prevalencia de obesidad y sus trastornos metabólicos asociados, tales como insulinoresistencia y Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT 2) se encuentran en aumento en todo el mundo (Grundy, 2008). Por otra parte, la relación entre las disfunciones hormonales reproductivas y los trastornos metabólicos en mujeres es un aspecto de gran interés terapéutico. En los estados hiperandrogénicos femeninos, existe obesidad de tipo central en más del 50% de los casos, y en un 50-70%, insulinoresistencia.

La hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG), normalmente secretada por la placenta, está estructural y funcionalmente relacionada con LH, y produce el mismo efecto biológico a través de la unión a un mismo receptor, estimulando la esteroidogénesis gonadal (Themmen y Huhtaniemi, 2000). Con el fin de lograr una elevada actividad de LH/hCG circulante, se han desarrollado ratones transgénicos portadores de los genes de las subunidades α y β de hCG bajo el promotor universal Ubiquitina C, que dirige la expresión génica en muchos tipos celulares desde un estadio fetal tardío. Mientras que las hembras con sobreexpresión de hCG β presentan niveles moderados de hCG circulante (30 veces superiores a los hallados en hembras WT), en hCG $\alpha\beta$ se producen niveles elevados de esta hormona que alcanza valores 1000 veces superiores a los WT, en términos de bioactividad (Rulli y col., 2002, 2003; Huhtaniemi y col., 2005). En el modelo de ratones transgénicos hCG β +, las hembras presentan pubertad precoz y son infértiles. Los ovarios se muestran con quistes hemorrágicos ocasionales y altamente luteinizados como consecuencia de la activa estimulación con hCG. Estos animales producen elevados niveles circulantes de andrógenos, estrógenos y progesterona.

na desde edades tempranas del desarrollo sexual. Se han detectado también varios fenotipos extragonadales en este modelo: a edades avanzadas, las hembras desarrollan hiperprolactinemia acompañada de macroprolactinomas y tumores mamarios metastásicos. También es de destacar el desarrollo de obesidad y el aumento en la densidad mineral ósea en estas hembras. Los complejos cambios hormonales, y consecuentemente el desarrollo del fenotipo extragonadal característico, se atribuyen a la hiperestimulación crónica del ovario por hCG, ya que la ovariectomía impide su formación, a pesar de mantener una persistente y elevada secreción de hCG (Rulli y col., 2002). Las hembras doble transgénicas hCG $\alpha\beta$ + presentan pubertad precoz, infertilidad, significativas alteraciones en el perfil de hormonas esteroideas circulantes desde edades tempranas de la maduración sexual, y desarrollo temprano de tumores de ovario de tipo teratoma (Huhtaniemi y col., 2005).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar posibles alteraciones en el metabolismo glucídico y lipídico en ratones hembras adultas en dos modelos transgénicos hipersecretores de hCG con niveles circulantes moderados (hCG β +) y elevados (hCG $\alpha\beta$ +) de la hormona. Se analizó en qué medida están afectados los perfiles glucémicos basales, test de tolerancia a glucosa, test de respuesta a insulina y el perfil lipídico en ambos modelos.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Se utilizaron cepas de ratones transgénicos portadores de los genes de hCG α y hCG β bajo el promotor Ubiquitina C (hCG α +, hCG β +) según descrito por Rulli y col. (2002, 2003). Los animales fueron mantenidos a 22 °C, con periodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, una dieta balanceada y agua *ad libitum*. 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. Se utilizaron ratones hembras de la cepa salvaje (WT), hCG β + y hCG $\alpha\beta$ + en ayuno por 6 horas.

Se realizaron las determinaciones de triglicéridos, colesterol y HDL en suero a través de un Kit colorimétrico por espectrofotometría (BioSystems), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Test de tolerancia a la glucosa: se administró a los ratones ayunados 40% de glucosa (2g/kg) por vía i.p. Test de respuesta a la insulina: se administró a los ratones ayunados 0.75 UI de insulina por vía i.p. En ambos casos,

se determinó la glucosa en sangre a los 0, 30, 60 y 90 min a través de tiras reactivas Accu-Chek Performa (Roche).

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 analizaron los valores séricos de triglicéridos en ayuno de hembras WT, hCG β + y hCG $\alpha\beta$ (Fig. 1 A). Los niveles de trigliceridemia resultaron significativamente mayores en animales hCG β + y hCG $\alpha\beta$ + comparados con los WT, alcanzando valores superiores a 600 mg/dl.

Los niveles séricos de colesterol en ayuno no mostraron diferencias significativas entre los grupos. Dichos valores no superaron los 200 mg/dl. Los valores séricos de HDL en ayuno no resultaron significativamente alterados en los ratones hCG β + y hCG $\alpha\beta$ + con respecto a los WT, si bien se detectó una disminución estadísticamente significativa en el grupo hCG β + con respecto al hCG $\alpha\beta$ (Fig. 1 B).

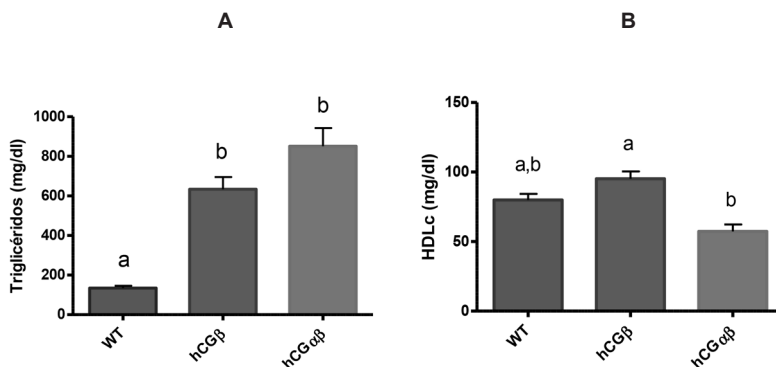


Figura 1. Perfil lipídico en ayuno de ratones hembra WT, hCG β + y hCG $\alpha\beta$ + a los 6 meses de edad. A) Valores séricos de triglicéridos. N= 3. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,01$). B) Valores séricos de HDL-C. N= 3-4; ($p < 0,001$). ANOVA de una vía – Bonferroni. Las barras representan la media + ES.

La insulinemia basal en ambos grupos transgénicos mostraron valores significativamente superiores que los WT (WT: 0.14 ± 0.07 ; hCG β +: 0.8 ± 0.2 ng/ml, $p < 0.05$ y hCG $\alpha\beta$ +: 2.4 ± 0.5 ng/ml, $p < 0.001$). El test de tolerancia a la glucosa mostró un marcado aumento en la concentración de glucosa en sangre a los 30 y 60 min post-glucosa en los grupos hCG β + y hCG $\alpha\beta$ + con respecto a los WT (Fig. 2 A). El test de respuesta a insulina resultó en niveles basales de glucosa en los grupos hCG β + y hCG $\alpha\beta$ + comparados con el grupo WT a los distintos tiempos (Fig 2B).

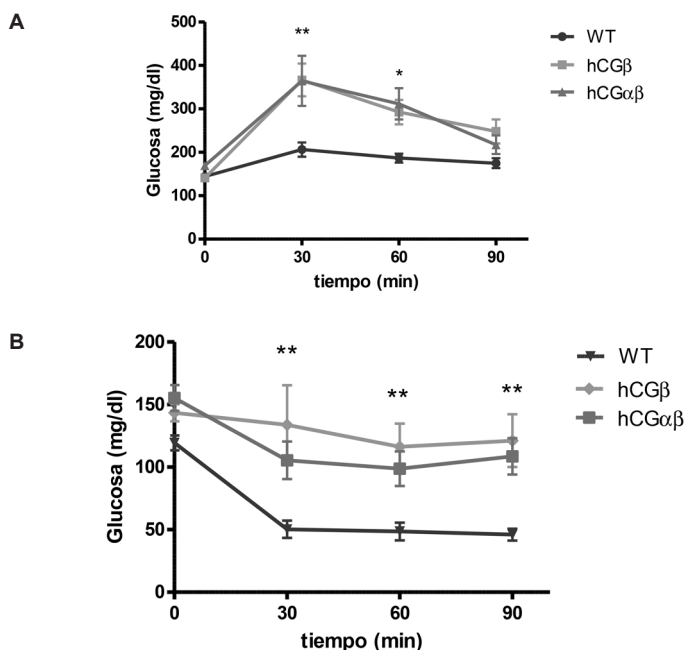


Figura 2. Metabolismo glucídico en ratones hembra WT, hCG β + y hCG $\alpha\beta$ + a los 6 meses de edad. A) Test de tolerancia a la glucosa, tras una inyección i.p. de 2 g/kg de glucosa. B) Test de respuesta a la insulina, tras una inyección i.p. de 0.75 UI/kg de insulina. Media $\pm$ ES. N= 6-10. Los asteriscos indican diferencias significativas entre hCG β + y hCG $\alpha\beta$ + vs. WT (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$). ANOVA de dos vías – Bonferroni.

Con el fin de establecer con mayor precisión la edad en que comienzan las alteraciones en el metabolismo glucídico de las hembras hCG β +, se realizaron estudios de tolerancia a la glucosa y de respuesta a la administración de una dosis de insulina a los 2, 3 y 6 meses de edad.

A los 2 meses de edad, las curvas de tolerancia a la glucosa resultaron similares en las hembras WT y hCG β +. Sólo se observó un aumento significativo a los 60 min post-glucosa (Fig. 3A). Tanto a los 3 como a los 6 meses de edad se detectó un aumento significativo en hembras hCG β + a los 30, 60 y 90 minutos post-glucosa (Fig. 3B,C).

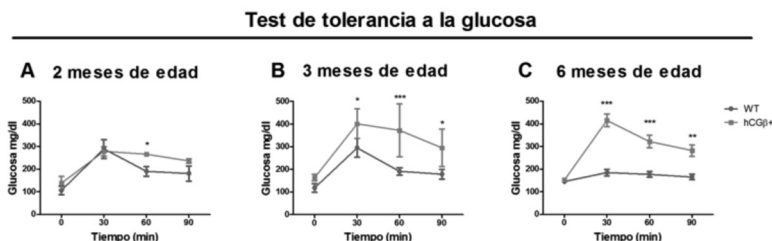


Figura 3. Test de tolerancia a la glucosa en hembras WT y hCG β + en función de la edad. Curvas de tolerancia a la glucosa en hembras WT y hCG β + a los 2 (A), 3 (B) y 6 (C) meses de edad. Se determinaron los niveles de glucosa en sangre de animales en ayuno a los 0, 30, 60 y 90 min luego de una inyección de glucosa (2 gr/kg, vía i.p.). Media $\pm$ ES, n=3-11. ANOVA de dos vías, Test de Bonferroni con medidas repetidas; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ y ***: $p < 0,001$.

El test de respuesta a insulina demostró que no se detectaron diferencias entre los animales WT y hCG β + a los 2 y 3 meses de edad (Fig. 4A,B). A los 6 meses se observó una diferencia significativa en los niveles de glucosa en las hembras hCG β + a los 30, 60 y 90 minutos post-insulina (Fig. 4C). Estos resultados sugieren la adquisición de una resistencia a la insulina por parte de las hembras hCG β + a los 6 meses de edad.

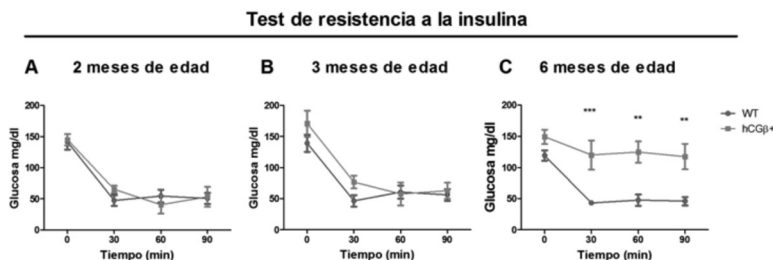


Figura 4. Test de respuesta a la insulina en hembras WT y hCGβ+ en función de la edad. Curvas de respuesta a la insulina en hembras WT y hCGβ+ a los 2 (A), 3 (B) y 6 (C) meses de edad. Se determinaron los niveles de glucosa en sangre de animales en ayuno a los 0, 30, 60 y 90 min luego de una inyección de insulina (0.75 UI/kg, vía i.p.). Media ± ES, n=4-11. ANOVA de dos vías, Test de Bonferroni con medidas repetidas; **: p<0,01 y ***: p<0,001

DISCUSIÓN

En este trabajo se caracterizó por primera vez el metabolismo glucídico y lipídico de ratones hembras adultas hipersecretoras de hCG. El tipo de Obesidad que presenta este modelo es principalmente debido al aumento de tejido adiposo en la región abdominal (Rulli y col., 2002), que podría explicarse por distintos mecanismos que involucran una excesiva producción de hormonas gonadales y sus implicancias a nivel metabólico. En el contexto del Síndrome Metabólico, los lípidos que se evalúan son los triglicéridos y el HDL-C, siendo la hipertrigliceridemia un marcador de gran utilidad para su diagnóstico. El modelo que se estudió presentó hipertrigliceridemia, niveles de HDL-C disminuidos, colesterol conservado e índices Colesterol/HDL-C y Triglicéridos/HDL-C elevados. Todos estos hallazgos contribuyen a un fenotipo aterogénico y con mayor riesgo cardiovascular. El perfil lipídico presentado por los ratones hipersecretoras de hCG podría explicarse por la presencia de Obesidad e insulinoresistencia. Similar situación se observa en la dislipidemia de la DMT 2. La hiperinsulinemia predispone a un incremento de los ácidos grasos libres, que provoca un aumento en la producción de triglicéridos, disminución de HDL-C y aumento en la producción de factores inflamatorios en el adipocito, directamente involucrados en la formación de la placa de ateroma (Reaven 2006).

La acción de la LH/hCG sobre el metabolismo de los hidratos de carbono y de los lípidos es aún desconocida. Los resultados obtenidos indican que los ratones hembra hipersecretore de hCG presentan hiperinsulinemia, insulinoresistencia evidenciada por la intolerancia a la glucosa, alteración en la insulinemia tras estímulo con glucosa, disminución de la respuesta a la insulina y alteración en los índices de insulinoresistencia, HOMA-IR y QUICKI. Estos resultados sugieren que la insulinoresistencia sería atribuible a la hiperestimulación de la esteroidogénesis gonadal por parte de la hCG y a la obesidad visceral que presentan estos ratones. No se puede descartar la participación de la hiperprolactinemia en estos cambios, dado que existen datos clínicos que sugieren que la prolactina elevada tiene efectos diabetogénicos y se asocia con frecuencia con hiperinsulinemia e insulinoresistencia (Ben-Jonathan y col., 2008). Además, resta por determinar cuál es la implicancia de un efecto directo de la hCG sobre el metabolismo glucídico, en particular la respuesta del páncreas a un estímulo postprandial.

Los trastornos en los glúcidos y los lípidos encontrados en el modelo hCG+ son manifestaciones del Síndrome Metabólico y con frecuencia se diagnostican en pacientes con estados hiperandrogénicos. Estas patologías han adquirido importancia debido a su elevada incidencia, sus complicaciones y la carga que sus costos implican para la sociedad. La comprensión de su etiopatogenia desde el ámbito de la investigación básica nos permitirá orientar los estudios que sean necesarios para su aplicación clínica en el diagnóstico y tratamiento precoz.

ABSTRACT

Metabolic syndrome is a growing epidemic; it increases the risk for diabetes, cardiovascular disease, fatty liver and several cancers. Women with hyperandrogenic conditions present with central obesity in over 50% of cases and insulin resistance in 50-70%. Transgenic female mice overexpressing the human chorionic gonadotropin β and α/β -subunit (hCG β + and hCG $\alpha\beta$ + mice), are obese, have constitutively elevated levels of hCG and increased production of testosterone, progesterone and prolactin. The objective of this study was to investigate possible alterations of the glucose and lipid metabolism in adult hCG β + and hCG $\alpha\beta$ + females, and the influence of gonadal steroids in this process. We evaluated fasting levels of serum of triglycerides,

cholesterol, HDL-C, glucose and insulin levels in wild-type (WT) and transgenic females at 6 months of age. Glucose and insulin response tests were also determined in these mice. Both adult hCG β + and hCG $\alpha\beta$ + females showed increased body weight with accumulation of visceral adipose tissue, accompanied by hyperinsulinemia (WT: 0.14 ± 0.07 ; hCG β +: 0.8 ± 0.2 ng/ml, $p < 0.05$ and hCG $\alpha\beta$ +: 2.4 ± 0.5 ng/ml, $p < 0.001$), glucose intolerance and insulin resistance, as manifested by decreased response to insulin, increased HOMA (homeostatic model assessment, for assessing beta cell function and insulin resistance) and decreased QUICKI (quantitative insulin sensitivity check index) ratios. We also showed that glucose intolerance started at 3 months of age, whereas insulin resistance started at 6 months of age. Lipid profile showed elevated triglyceride levels (WT: 134.9 ± 11.7 ; hCG β +: 633.9 ± 61.4 mg/dl and hCG $\alpha\beta$ +: 851.4 ± 91.2 mg/dl, $p < 0.01$), conserved cholesterol and increased atherogenic indices (cholesterol/HDL-C and triglycerides/HDL-C) in transgenic females. These results demonstrate that hCG overexpression together with hyperandrogenism and obesity in adult female mice are associated to hyperinsulinemia, insulin resistance and dyslipidemia. These findings provide essential information for further studies on the involvement of gonadotropins and steroid hormones in metabolic disorders.

REFERENCIAS

1. Ben-Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW. What Can We Learn from Rodents about Prolactin in Humans? *Endocr Rev* 29: 1–41, 2008.
2. Cole LA. Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reprod Biol Endocrinol* 8:102, 2010.
3. Grundy SM. Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 629–636, 2008.
4. Huhtaniemi I, Rulli SB, Ahtiainen P, Poutanen M. Review: Multiple sites of tumorigenesis in transgenic mice overproducing hCG. *Mol Cell Endocrinol* 234: 117–126, 2005.
5. Ratner LD, Rulli SB, Huhtaniemi IT. Genetically modified mouse models addressing gonadotropin function. *Reprod Biol* 14(1):9–15, 2014.
6. Reaven GM. The metabolic syndrome: is the diagnosis necessary? *Am J Clin Nutr* 83:1237–1247, 2006.
7. Rulli SB, Ahtiainen P, Makela S, Toppari J, Poutanen M, Huhtaniemi I. Elevated steroidogenesis, defective reproductive organs, and infertility

- in transgenic male mice overexpressing human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 144: 4980–4990, 2003.
8. Rulli SB, Kuorelahti A, Karaer O, Pelliniemi LJ, Poutanen M, Huhtaniemi I. Reproductive Disturbances, Pituitary Lactotrope Adenomas, and Mammary Gland Tumors in Transgenic Female Mice Producing High Levels of Human Chorionic Gonadotropin. *Endocrinology* 143: 4084–4095, 2002.
 9. Themmen AP, Huhtaniemi I. Mutations of Gonadotropins and Gonadotropin Receptors: Elucidating the Physiology and Pathophysiology of Pituitary-Gonadal Function. *Endocr Rev* 21: 551–583, 2000.

INFLUENCIA DE LOS RECEPTORES DE LA ANAFILOTOXINA C5A EN LA MODULACIÓN DE CITOQUINAS EN LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR CEPAS LOCALES DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* MULTIRRESISTENTES A DROGAS.

Sabio y García, Carmen Alejandra y González, Alejandra.

Laboratorio de Inmunología de Enfermedades Respiratorias. Instituto de Medicina Experimental, IMEX CONICET- Academia Nacional de Medicina.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa que aún hoy sigue siendo un problema de salud a nivel mundial, agravado por la aparición de cepas multirresistente a las drogas de primera línea (cepas MDR). Según el último informe de la Organización Mundial de la Salud, en el 2011 se reportaron casi 9 millones de nuevos casos de TB y 1.4 millones de muertes. La notificación de casos de TB para nuestro país en el 2011 fue de 23,61/100.000 habitantes; y entre 2003 y 2011 un promedio de 118 casos por año fueron debido a cepas MDR (Base de datos de MDR Servicio de Micobacterias INEI ANLIS Carlos G Malbrán). El avance en las técnicas de genotipificación molecular han permitido identificar a las cepas MDR M y Ra que produjeron brotes en Buenos Aires y Rosario, respectivamente¹, y que se encuentran hoy diseminadas en la comunidad². *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), su agente etiológico, es un patógeno intracelular que entra al organismo por vía aérea y establece un nicho dentro de los macrófagos alveolares donde es capaz de replicarse. La progresión de la infección dependerá en gran parte del encuentro inicial entre el patógeno y la célula fagocítica: la activación directa o indirecta de diversos receptores por parte del *Mtb* lleva a interacciones particulares entre los mismos modulando la participación de vías específicas en la célula infectada. Estos receptores pueden primar a las células del sistema inmune para activarlas, inhibir o modificar su activación, o directamente permitir una entrada silenciosa de la bacteria a la célula presentadora de antígeno (CPA), lo que determina el desarrollo de la respuesta inmune contra el patógeno. Un control exitoso de la enfermedad requiere de la producción de IL-12 y TNF- α por parte de los macrófagos, así como de la activación de una respuesta adaptativa de tipo Th1 con producción de IFN γ e inducción de células citotóxicas^{3,4}. Estudios de nuestro grupo demostraron que

las cepas locales MDR M y Ra inducen un perfil Th1/Th2/Th17 alterado y una respuesta citotóxica deficiente. En particular, la cepa M es una pobre inductora de IFN γ y de respuesta citotóxica mediada por linfocitos T CD8⁺ ⁵ e induce una mayor expansión de linfocitos T IL-17⁺ que otras cepas analizadas⁶.

Diversos trabajos muestran que *Mtb* activa al sistema de complemento (C)⁷⁻¹⁰. El C no sólo es uno de los componentes más importantes de la inmunidad innata, sino que recientemente se demostró que regula la expresión de citoquinas por células del sistema inmune y funciones efectoras en monocitos (Mo). Así, además de su conocida función efectora innata sobre patógenos (como opsonización y lisis), una creciente bibliografía propone al C, y particularmente a la anafilotoxina C5a, como un puente entre la respuesta inmune innata y la adaptativa¹¹⁻¹³. C5a cumple sus funciones a través de 2 receptores: C5aR y C5L2. Si bien ambos son receptores de 7 pasos transmembrana y se expresan mayormente en las CPA, C5aR está asociado a proteína G, mientras C5L2 no lo está y su función es menos conocida. Varios trabajos han demostrado los efectos de estos receptores en la modulación de citoquinas tanto de células monocíticas como de linfocitos.

Teniendo en cuenta que las cepas locales MDR M y Ra, inducen perfiles de citoquinas particulares, nos propusimos evaluar la influencia de los receptores de la anafilotoxina C5a en la modulación de dichos perfiles. Nuestra hipótesis de trabajo es que los productos de activación del C actuando a través de sus receptores en los Mo, en particular los receptores de la anafilotoxina C5a, C5aR y C5L2, modulan otras vías de activación, conduciendo a una respuesta inmune diferencial para cada aislado clínico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*): Las cepas MDR M y Ra, provenientes de aislados clínicos fueron cedidas por el Servicio de Micobacterias del instituto Malbrán y la cepa de referencia H37Rv se obtuvo a través de la Universidad de Colorado (John Belisle). Las cepas fueron crecidas en caldo de cultivo Middle-brook 7H9 hasta la fase de crecimiento logarítmico y luego inactivadas por irradiación y resuspendidas en solución fisiológica a una concentración de 1x10⁸ bacteria/ml.

Dadores: Se utilizó sangre de pacientes con tuberculosis pulmonar activa (TB) provenientes del servicio de Neumonología del Hospital A. Posadas,

previa autorización de los mismos vía consentimiento informado tanto para la extracción de sangre como para participar en el estudio de investigación, sugerido por el Comité de Ética. Se excluyeron los pacientes con serología positiva para HIV y con otras enfermedades infecciosas. Como controles sanos (DS) se utilizaron *buffy coats* del servicio de Hematología del Hospital Fernández o sangre venosa de voluntarios. Los dadores sanos PPD⁺ (PPD) fueron reclutados utilizando la técnica de tuberculina, estableciéndose una induración $\geq 10\text{mm}$ como punto de corte.

Colección de suero y medición de C5a: Se extrajo 15 ml de sangre venosa a dadores sanos (DS) y pacientes con TB. La sangre se dejó 30-60 minutos a 37°C, se alicuotó y se guardó a -70°C hasta su uso. La medición de C5a se realizó por la técnica de ELISA utilizando un kit comercial, siguiendo las especificaciones del fabricante.

Separación de células mononucleares: Se extrajo 50 ml de sangre con heparina y se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) por centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque. Las células se recolectaron de la interfase y se suspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 conteniendo antibióticos y suero fetal bovino inactivado por calor (SFB) o suero autólogo, según el experimento.

Aislamiento y cultivo de monocitos-macrófagos (Mo-MØ): Se adhirieron CMSP en placa de 24 pozos durante 2 hs a 37° C y se retiraron las células no adherentes. Los Mo se cultivaron durante 18hs, 48 hs o 6 días en presencia de las distintas cepas de *Mtb* en una relación 1:2 en medio completo (RPMI, SFB 10%, antibiótico 1µl/ml).

Co-cultivo de monocitos-linfocitos para el estudio de la expresión de citoquinas: Se aislaron Mo según lo descrito anteriormente. Las células no adherentes se reservaron en medio completo durante 18 hs a 4°C. Se bloquearon los receptores de C5a en los Mo adheridos cultivando las células con los respectivos anticuerpos bloqueantes por una hora. Posteriormente se pulsaron las células con las distintas cepas de *Mtb* en una relación 1:2 por 18hs. Al día siguiente se agregaron los linfocitos autólogos y se cultivaron por 5 días más en medio completo (RPMI, suero autólogo 20%, antibiótico 1µl/ml).

Determinación de receptores de superficie y citoquinas (CK): Se determinó la expresión en Mo de los receptores C5L2 y C5aR empleando anticuerpos monoclonales conjugados con un fluorocromo. Para medir expresión intracitoplasmática de citoquinas (CK), 6 hrs antes de finalizar el cultivo se trataron a las células con Brefeldina A para impedir la secreción de las mismas, luego se realizó una técnica de doble tinción, con fijación de las células y posterior permeabilización de la membrana. Se recolectaron 20,000 eventos empleando un citómetro de flujo FACScan y se emplearon controles de isotipo irrelevantes conjugados con el fluorocromo correspondiente para determinar auto-fluorescencia y marcación inespecífica.

Estadística: Para comparar la respuesta a distintos tratamientos se utilizó la prueba no paramétrica de Friedman seguida de la prueba de Wilcoxon o Mann Whitney según se tratara de datos pareados o no pareados, respectivamente. Se adoptó el nivel de significancia de $p < 0.05$.

RESULTADOS

En primer lugar, comparamos los niveles *ex vivo* de C5a y de sus receptores, C5aR y C5L2, entre pacientes con tuberculosis activa (TB) y dadores sanos (DS). La determinación de los niveles de C5a se realizó por ELISA de los sueros de sangre venosa de TB y DS. Los niveles de expresión de C5aR y C5L2 fueron determinados a partir de Mo de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) recientemente purificadas. Las CMSP fueron marcadas con anticuerpos específicos y analizadas por citometría de flujo.

Como se observa en la Figura 1.A, las concentraciones séricas de C5a no difieren entre TB y DS. Por el contrario, el nivel de los receptores difiere entre ambos grupos. En particular, observamos una disminución en la intensidad media de fluorescencia del receptor C5L2 en pacientes, mientras que los niveles de C5aR son similares (Figura 1.B). Cabe destacar que analizamos estos receptores en linfocitos a 0hs no encontrando su expresión.

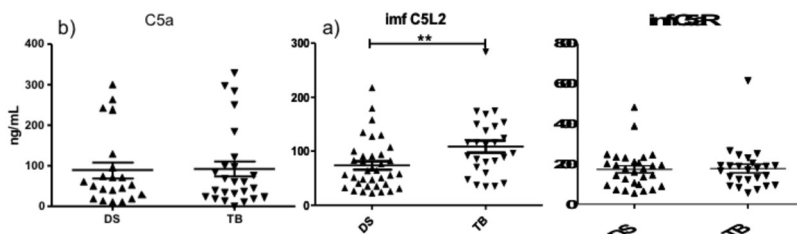


Figura 1. Expresión ex vivo de la anafilotoxina C5a y de sus receptores C5aR y C5L2. a) Los niveles séricos de C5a fueron medidos por la técnica de ELISA; N DS=21 TB=25. b) La intensidad media de fluorescencia (imf) de los receptores C5aR y C5L2 fueron determinados en células CD14⁺ de CMSP por citometría de flujo; N DS=36; TB=26. Estadística: los datos fueron expresados como medianas y percentilos 25-75. Se utilizó el test estadístico no paramétrico de Friedman seguido por el tes de Wilcoxon; * $p < 0.05$.

A continuación se analizó si las distintas cepas en estudio modulaban la expresión de los receptores C5aR y C5L2 en Mo en diferenciación a macrófagos (CD14⁺). Para ello cultivamos Mo obtenidos por adhesión en placa a partir de CMSP en presencia de las cepas de *Mtb* M, Ra y H37Rv y determinamos la expresión a 18hs, 48hs y 6 días de cultivo.

Como se muestra en la Figura 2, ambos receptores, C5aR y C5L2, disminuyen su expresión en células CD14⁺ a las 48hs independientemente de la presencia de *Mtb*. De 48hs a 6 días, se observa una disminución significativa del porcentaje de CD14⁺ que expresan C5aR en presencia de las cepas H37Rv y Ra. Además H37Rv, induce en todos los tiempos analizados una disminución de las células CD14⁺C5aR⁺, mientras que M y Ra, sólo disminuyen este porcentaje al sexto día. La expresión de C5L2 en el día 6 aumenta respecto a las 48hs, en el control y en las células cultivadas en presencia de Ra. Para cada tiempo analizado la expresión de C5L2 varía respecto del control, según la cepa con la que se estimularon los Mo. Por lo tanto, concluimos que la expresión de los receptores de la anafilotoxina C5a, C5aR y C5L2, en Mo en diferenciación a macrófagos es regulada diferencialmente por las distintas cepas de *Mtb* analizadas.

Como se mencionó anteriormente, las cepas MDR locales Ra y M, inducen perfiles de citoquinas alterados, comparados con el de la cepa de referencia H37Rv. En particular, la cepa M es un pobre inductora de IFN γ y tiende a inducir una mayor expresión de IL-4 que las cepas Ra y H37Rv en linfocitos T CD4⁺, lo que sugiere que esta cepa activa una respuesta

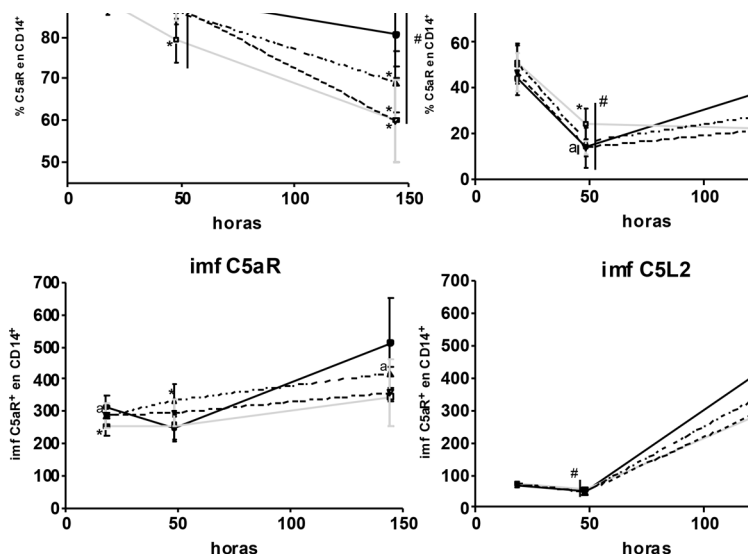


Figura 2. Expresión temporal de los receptores de C5a en monocitos estimulados con diferentes cepas de *Mtb*. Se midió la expresión de C5aR y C5L2 en células CD14⁺ estimuladas o no con las cepas H37Rv, M y Ra a las 18hs, 48hs y 6 días. N=10. Estadística: los datos fueron expresados como medianas y percentilos 25-75. Se utilizó el test estadístico no paramétrico de Friedman seguido por el test de Wilcoxon; la significancia estadística se estableció en $p < 0.05$: #, todas las cepas 18hs vs 48 hs o 6 días; &, 48hs vs 6 días; *, cepa vs control; a, H37Rv vs M o Ra.

inmune del tipo Th2. A raíz de esta observación, nos propusimos estudiar el efecto del bloqueo de los receptores C5aR y C5L2 sobre la producción de citoquinas inducida por las cepas. Brevemente, se bloquearon los receptores C5aR o C5L2 con anticuerpos específicos y se estimularon con las cepas M, Ra y H37Rv; pasadas 18hs de cultivo se incorporaron los linfocitos autólogos y se dejaron en cultivo por 5 días más, para permitir la expresión de citoquinas. Se midió la expresión de citoquinas intracitoplasmáticas por citometría de flujo en dadores sanos PPD⁺ (PPD) y en pacientes con tuberculosis activa (TB).

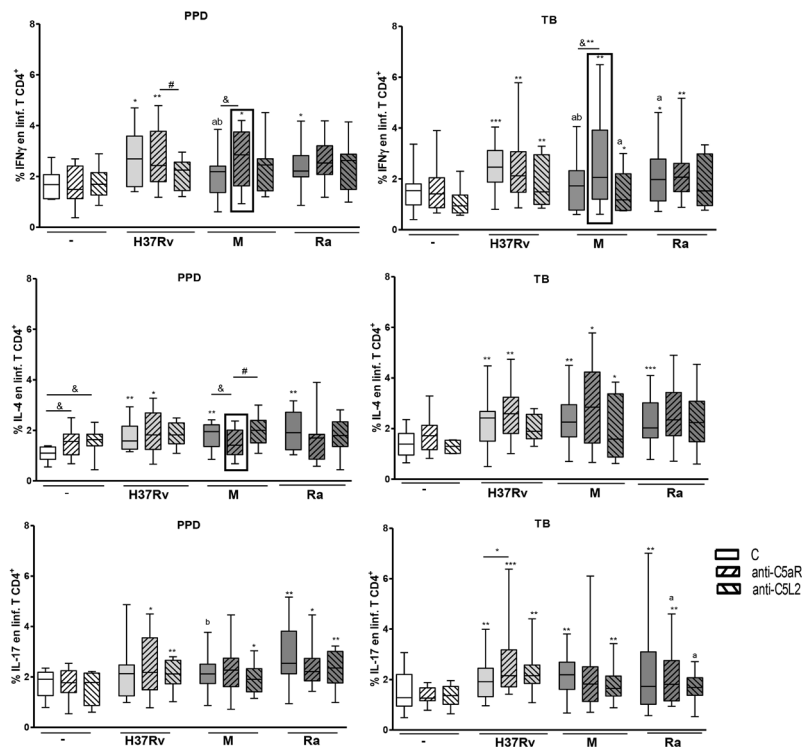


Figura 3. Efecto del bloqueo de los receptores de C5a en la producción de citoquinas por células T CD4⁺. Los receptores C5aR y C5L2 de monocitos fueron bloqueados o no con anticuerpos específicos antes de ser estimulados con las cepas de Mtb H37Rv, M o Ra. Luego de 18hs de co-cultivo, se agregaron los linfocitos autólogos y se continuó el cultivo por 5 días más. Se midió la expresión intracelular de IFN- γ , IL-4 e IL-17 en linfocitos T CD4⁺ de dadores sanos PPD+ y en pacientes con tuberculosis activa, TB. N: PPD=10 TB=20. Estadística: los datos fueron expresados como medianas y percentiles 25-75; se utilizó el test no paramétrico de Friedman seguido por el test de Wilcoxon; la significancia estadística se fijó en $p < 0.05$. * control vs cepas; & bloqueo de C5aR o C5L2 vs sin bloquear; # bloqueo de C5aR vs bloqueo de C5L2.

En primer lugar, y en concordancia con datos previos de nuestro laboratorio, se observa que las cepas H37Rv y Ra inducen la expresión de IFN γ en linfocitos T CD4⁺, contrariamente, la cepa M no estimula su expresión. Sin embargo, cuando se bloquea el receptor de C5aR en Mo, se observa

un aumento significativo en la expresión de dicha citoquina en las células T CD4⁺ tanto en dadores PPD como en TB. Por otro lado, sólo en el grupo PPD observamos una disminución en la expresión de IFN γ en presencia del anticuerpo bloqueante para C5L2, respecto al bloqueo con C5aR. En concordancia con este resultado, se observa que el bloqueo de C5aR inhibe la expresión de IL-4 en presencia de la cepa M, aunque esto último sólo se observó en CMSP provenientes de PPD. Llamativamente, el bloqueo de ambos receptores induce un aumento espontáneo de IL-4 en ausencia de estímulo en el mismo grupo. En el grupo de TB no se observa ningún efecto de los bloqueos sobre la producción de esta citoquina. Por último, analizamos el efecto sobre la expresión de IL-17 y observamos que en el grupo TB, el bloqueo de C5aR promueve un aumento en la expresión de esta citoquina inducida por H37Rv. Concluimos que ambos receptores, C5aR y C5L2, modulan la expresión de las citoquinas analizadas en linfocitos T CD4⁺, siendo esta modulación dependiente de la cepa y del dador.

DISCUSIÓN

Si bien el sistema de complemento fue considerado, por mucho tiempo, fundamentalmente como uno de los componentes más importantes en la inmunidad innata, una creciente bibliografía demuestra que participa además en la modulación de la respuesta adaptativa adjudicándosele un rol relevante a la anafilotoxina C5a, a través de sus receptores C5aR y C5L2. En este trabajo demostramos que dichos receptores participan en la modulación de la respuesta inmune adaptativa inducida por distintas cepas de *Mtb* y que dicha modulación es dependiente de la cepa y del dador.

En primer lugar observamos que los pacientes con tuberculosis activa tienen una mayor expresión de C5L2 en monocitos CD14⁺ de sangre periférica. No encontramos diferencias entre pacientes y dadores sanos en los niveles sistémicos de C5a, sin embargo no podemos descartar que existan diferencias en el sitio de infección; en este sentido existen estudios que muestran que los niveles de distintos productos de activación del complemento están elevados en derrames pleurales tuberculosos^{7,9}. Por otro lado, observamos que la expresión *in vitro* de ambos receptores en monocitos CD14⁺ es modulada por las cepas, y que cada una los modula de manera diferente. Por último, encontramos que el bloqueo previo de C5aR y C5L2 en monocitos estimulados con las distintas cepas de *Mtb* altera el perfil de

citoquinas inducido por las mismas y que este efecto depende de la cepa y el dador. Particularmente relevante resultó que el bloqueo de C5aR revierte la baja inducción de IFN γ observada al estimular con la cepa M, reportada por nuestro grupo, tanto en pacientes como en dadores sanos⁵. En el mismo sentido, el bloqueo de C5aR en monocitos estimulados con la cepa M también disminuye la producción de IL-4 inducido por la misma cepa⁵. Es decir, que el bloqueo de C5aR modifica el perfil de activación de Th2 inducido por la cepa M a un perfil Th1, lo que indica que este receptor juega un rol importante en la modulación de citoquinas en la respuesta inmune contra la cepa M. Queda por dilucidar el mecanismo por el cual el bloqueo de este receptor en monocitos incide sobre la activación de los linfocitos T. En este sentido, se ha demostrado que células dendríticas de ratones *knock out* para C5aR tienen disminuida la capacidad de producción de IL-12 e inducen la diferenciación de células T a Th17 o Treg, pero no a Th1¹⁴. El mismo grupo observó el efecto contrario en macrófagos peritoneales donde la activación del receptor C5aR inhibe la producción de IL-12¹⁵. En humanos, el agregado de C5a disminuye la producción de IL-12 por los monocitos¹⁶. Respecto a C5L2, la bibliografía es más escasa y controversial adjudicándole en algunos casos un rol como modulador de la respuesta Th2¹⁷, o por el contrario, como receptor *decoy*¹⁸. Si bien con este diseño experimental no hemos encontrado, en general, en los grupos analizados un efecto claro debido al bloqueo del receptor C5L2, algunas tendencias indicarían que este receptor podría tener un efecto modulador contrapuesto al de C5aR en el caso de la expresión de IFN γ e IL-4, lo cual estaría en concordancia con parte de la bibliografía. En particular, se observa que en TB mientras el bloqueo de C5aR lleva a un aumento en la producción de IFN γ inducido por la cepa M, el bloqueo de C5L2 tiende a disminuir la expresión de dicha citoquina, comparando con el grupo control sin bloquear. En los linfocitos T CD4⁺ de PPD co-cultivados con monocitos inducidos con la cepa H37Rv hay una diferencia significativa en la expresión de IFN γ entre el grupo bloqueado para C5aR vs C5L2, mientras que para IL-4 la diferencia del efecto entre ambos receptores se ve en la inducción con la cepa M.

Hasta el momento, hemos observado un efecto del bloqueo de C5aR y, en menor medida, de C5L2 en la modulación de la respuesta inmune adaptativa hacia distintas cepas de *Mtb* en células T CD4⁺. En el futuro nos proponemos estudiar el impacto directo de estos receptores sobre los monocitos y su posible influencia en la respuesta observada en linfocitos.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease, caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), which represents a major world health problem, aggravated by the appearance of multidrug resistance strains (MDR). In Argentina, the notification of new cases in 2011 was of 23.61/100000 inhabitants; and an average of 118 of the cases reported between 2003 and 2011 were due to MDR strains. Outbreak MDR local strains M and Ra are nowadays spread in the community and induce a particular adaptive immune response with an imbalance between Th1/Th2 profiles, which differs from the elicited by the laboratory strain H37Rv. We have previously shown that strain M is a poor inducer of IFN- γ , an essential Th1 cytokine for the control of infection, which might explain, at least in part, its epidemiological success. IFN γ has a critical role as an enhancer of macrophage bactericidal functions. Upon infection, Mtb first encounter with macrophages, and their surface receptors are important in shaping host adaptive immune response. Furthermore, Mtb activates complement system cascade. Growing evidence confer complement system, and particularly anaphylatoxin C5a complement receptors C5aR and C5L2, a relevant role in modulating host immune response profile in different experimental models.

The aim of this work is studying the role of complement system in the CD4 $^{+}$ T cell cytokine profile induced by the local Mtb strains M and Ra, and the laboratory strain H37Rv.

We analyzed the effect of C5a on Mtb-induced cytokine expression using blocking antibodies against both of its receptors. Herein, we found that C5a receptors participate in the modulation of CD4 $^{+}$ T cells, in a donor (healthy subject or tuberculosis patient) and Mtb strain (M, Ra or H37Rv)-dependent fashion. Particularly relevant was that C5aR blockade augmented IFN γ and lowered IL-4 expression induced by strain M, reprogramming the immune response towards a Th1 profile.

REFERENCIAS

1. Rittacco V., *et al.* J Infect Dis 176:637-642 (1997).
2. Rittacco V., *et al.* Emerg Infect Dis. 18 (11): 1802-1810 (2012).
3. Rook G A., *et al.* Nat. Rev. Immun. 5: 661-667 (2005).
4. Kaufmann S., Nat. Rev. Immun.. 1: 20-30 (2001).

5. Geffner L. *et al.* Infect Immun 77:5025-5034 (2009).
6. Basile J., *et al.* J. Inf. Dis 204(7):1054-64 (2011).
7. Hara N., *et al.* Chest 102, 1060-1064 (1992).
8. Salomaa E.R., *et al.* Chest 114, 723-730 (1998).
9. Porcel, J. *et al.* Int Med 4, 76-82 (2000).
10. Schorey, J. Science 277, 1091-1093 (1997).
11. Dunkelberger J., *et al.* Cell research 20, 34-50 (2010).
12. Ward, P. J Mol Med 87, 375-378 (2010).
13. Reis, E. *et al.* Eur J Immunolog. 40, 710-721 (2010).
14. Weaver *et al.* Eur J Immunolog. 40(3): 710–721 (2010).
15. Hawlisch H *et al.* Immun. 22:415–426 (2005).
16. Wittmann *et al.* J Immunol. 162(11):6763-9 (1999).
17. Hawlisch *et al.* Mol Immunol. 41(2-3):123-31 (2004).
18. Scola *et al.* Mol Immunol. 46(6):1149-62 (2009).

CANCER DE PROSTATA Y TEJIDO ADIPOSO. ESTUDIO DEL MICROAMBIENTE LOCAL Y DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL TEJIDO ADIPOSO PERIPROSTATICO Y CELULAS EPITELIALES TUMORALES PROSTATICAS

Investigadora principal: Dra. Paula Alejandra Sacca.

Colaboradora: Dra. Virginia Pistone

Instituto de Biología y Medicina Experimental, IBYME-CONICET

RESUMEN

El tejido adiposo periprostático (TAPP) cubre la glándula prostática. El tejido adiposo contiene células stem (CAS) multipotentes que pueden contribuir al desarrollo del cáncer. Se ha sugerido que las CAS locales reclutadas por las células tumorales podrían integrar el estroma vascular y fibrovascular en el tumor inicial. **Previamente demostramos que** moléculas secretadas por el TAPP podrían estar modulando la progresión de la enfermedad desde estadios tempranos del cáncer de próstata (CaP). **Objetivo:** estudiar la interacción entre células de CaP (LNCaP y PC3) y las CAS provenientes del TAPP. **Métodos:** aislamos CAS de TAPP proveniente de pacientes con CaP (CAS-T) y con hiperplasia benigna de próstata (CAS-B); las caracterizamos (citometría de flujo) y estudiamos multipotencialidad (diferenciación), perfil proteolítico (zimografía) y capacidad de migración (transwells) hacia LNCaP y PC3. **Resultados:** Las CAS fueron CD44, CD90 y CD105 positivas; CD34 positiva/baja y CD31 y CD45 negativas. La marcación fue menor para CAS-T vs CAS-B, significativa para CD90 y al límite de la significancia para CD44. Además, las CAS mostraron actividad de MMP-2. Las CAS-B se diferenciaron a los linajes adipogénico y osteogénico, mientras que solo el 33% de los cultivos de CAS-T lo hicieron. Encontramos que las CAS-B migran más que las CAS-T hacia las células tumorales prostáticas y fue mayor hacia células PC3 que a LNCaP. **Conclusiones:** las PC3 estarían liberando factores quimiotácticos para atraer a las CAS. En el TAPP las CAS de pacientes con CaP o una sub-población de las mismas pudieron migrado hacia la glándula prostática, por ser tejidos contiguos, lo cual podría ser posible dado que las CAS mostraron actividad de MMP. Esto se vio reflejado además por la disminución en el % de los marcadores de superficie CD y la disminución o pérdida de la capacidad de diferenciación

respecto a las CAS-B, indicio de que la interacción tumor-estroma estaría más comprometida en dichos pacientes.

ABSTRACT

Periprostatic adipose tissue (TAPP) covers the prostate gland. Adipose tissue contains multipotent stem cells (CAS) that can contribute to cancer development. Local CAS recruited by tumor cells may integrate the initial tumor fibrovascular network. Previously, we showed that PPAT derived factors could, in the early stages of prostate cancer (CaP), modulate disease progression. **Objective:** To study the interaction between PCa cells (LNCaP and PC3) and CAS from TAPP. **Methods:** CAS were isolated from TAPP of patients with CaP (CAS-T) and of benign prostatic hyperplasia (CAS -B). Characterization (flow cytometry), multipotentiality (differentiation), proteolytic profile (zymography) were conducted. Migration capacity (transwells) to LNCaP and PC3 was studied. **Results:** CAS were CD44+CD90+CD105+CD31+/lowCD34-CD45-. Expression was lower for CAS-T vs CAS-B, significant to CD90 and in the limit of significance for CD44. Furthermore, CAS showed MMP-2 activity. CAS -B could differentiate to osteogenic and adipogenic lineages, whereas only 33 % of CAS -T cultures did. We found that CAS -B migrate more than CAS -T towards prostate cancer cells, and was greater to PC3 cells than to LNCaP. **Conclusions:** PC3 could be releasing chemotactic factors to attract CAS. The decrease in the expression of CD markers, the reduction or loss of differentiation potential and decreased migration of CAS-T vs CAS-B shows that these cells may have left the adipose depot. TAPP isolated from patients with CAP CAS could migrate through the tissue towards the prostate gland, because they are adjacent tissues and also by the fact that CAS showed MMP activity. This results in a more committed tumor-stroma interaction which benefiting tumor growth in these patients.

ROL DE LOS IODOLÍPIDOS COMO REGULADORES DEL CRECIMIENTO NORMAL Y PATOLÓGICO DE LA GLÁNDULA TIROIDES

Lisa Thomasz

Comisión Nacional de Energía Atómica

INTRODUCCIÓN

El yodo es un componente clave en la fisiología tiroidea. El exceso de yodo generalmente provoca una disminución de la actividad metabólica foliular estimulada por TSH. Los efectos autorregulatorios incluyen entre otros al mecanismo de transporte y organificación del yodo, la síntesis y secreción de hormonas tiroideas, y la proliferación celular. Estudios nuestros y de otros laboratorios (Chazenbalk et al, Boeynaems et al., 1980) demostraron que para que el yodo ejerza su acción autorregulatoria debe ser incorporado a moléculas orgánicas. Los numerosos parámetros tiroideos que son inhibidos por el exceso de yodo, son liberados de esta inhibición si se incuba *in vitro* o administra *in vivo*, simultáneamente con el exceso de yodo, drogas que bloquean la acción de la peroxidasa tiroidea, como el metilmercaptoimidazol (MMI) o el propiltiouracilo (PTU). La naturaleza de este iodocompuesto aun no está totalmente dilucidada, pero se han postulado a los iodolípidos: 6-iodo-delta lactona (IL- δ) (Pisarev et al., 1992) y el 2-iodohexadecanal (2-IHDA) (Pannells et al., 1992_{a, b}) como mediadores del proceso autorregulatorio.

La síntesis de iodolípidos ocurre también en la glándula mamaria y podrían tener un rol en la regulación del crecimiento (Arroyo-Helguera et al., 2006). Nuñez-Anita mostraron el efecto antiproliferativo y pro-apoptótico de la IL- δ en una línea de cáncer de mama (MCF-7) y demostraron que la vía de PPAR- γ está involucrada en éste proceso.

La IL- δ inhibe la proliferación celular en diferentes tipos celulares de distinto origen como en la línea de neuroblastoma (SH-SY5Y) y en la línea de cáncer de mama (MCF-7) (Rosner et al., 2010). Y recientemente hemos demostrado que la IL- δ inhibe la proliferación celular en las líneas HT-29 (cáncer de colon), WRO (cáncer folicular de tiroides) y NPA (melanoma). Cabe aclarar que la mama organifica yodo (Freinkel & Ingbar, 1956) y sintetiza iodo-

lípidos (Arroyo-Helguera et al., 2006). En este caso las líneas HT-29 y NPA corresponden a tejidos de cáncer de colon y cáncer de piel respectivamente, que no organifican yodo. Hemos demostrado también, que la IL- δ induce la muerte por apoptosis, y estos eventos están relacionados con un aumento en los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS).

En esta oportunidad, nos propusimos estudiar el efecto de IL- δ sobre el crecimiento de las células HT-29 en un modelo in vivo, así como dilucidar los mecanismos involucrados en este proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Modelo animal

Ratones *NIH-nude* atímicos fueron implantados en la pata posterior derecha con 1.000.000 células HT-29. Luego de una semana, los ratones fueron inyectados diariamente con solución salina o con 10 μ g de IL- δ por animal.

La evolución de los animales se analizó mediante la medición del volumen tumoral con un calibre para tal fin, aplicando la siguiente fórmula:

$$(A^2 \times B)/2$$

donde A es el diámetro menor y B el diámetro mayor del tumor.

La medición de los tumores se realizó dos veces por semana durante 30 días. Finalizados los tratamientos los animales fueron sacrificados y los tumores fueron fijados en buffer formol al 10%, pH=7 para los posteriores estudios histológicos y otros se conservaron a -80 °C.

Electroforesis y transferencia de proteínas.

Para la siembra se utilizaron 40 μ g de muestra en *buffer* de carga 2x (glicerol 1,6 ml, β -mercaptoetanol 0,8 ml, Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) 2 ml, SDS 10% 3,2 ml y azul de bromofenol punta de espátula) previo calentamiento a 100 °C durante 3 min. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE 10% (electroforesis en gel de poliacrilamida) en *buffer* de corrida (0,25 M Tris base, 1,92 M glicina, 1% SDS). Finalizada la transferencia las membranas se lavaron con *buffer* TBS-T (Tris 10 mM pH 8, NaCl 150 mM + 0,05% Tween 20) y se bloquearon con TBS-T + 5% de compuesto bloqueante (*Amersham*) + 10%

albúmina bovina durante 1 h a temperatura ambiente, luego se enjuagaron dos veces con TBS-T y se lavaron en dicho *buffer* tres veces durante 15, 5 y 5 min respectivamente. A continuación se incubó con el primer anticuerpo durante toda la noche a 4 °C. Los anticuerpos utilizados fueron: anti-PCNA (*Santa Cruz*) en una dilución 1:500, anti-P27 (*Calbiochem*) en una dilución 1:500, anti actina (*sigma*) en una dilución 1:1.000. Posteriormente se repitió el esquema de enjuague y lavado anterior y se incubó con el segundo anticuerpo (dilución 1:3.000, *Amersham*) por una hora a temperatura ambiente. Se utilizó el método de quimioluminiscencia (*enhanced quimioluminiscence, Amersham Biosciences*) para visualizar las proteínas específicas. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias de densidad óptica, referidas en unidades porcentuales respecto al control.

Cuantificación de la muerte por apoptosis: Actividad de Caspasa-3.

Para cuantificar la actividad de caspasa-3 se utilizó el *Colorimetric Caspase-3 Assay Kit (Sigma CASP-3-C, Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo)*. La reacción se basa en la hidrólisis del sustrato peptídico *Ac-DEVD-pNA* por la caspasa-3 resultando en la liberación de *pNA* que se cuantifica espectrofotométricamente a 405 nm. Las muestras se rompieron con 50 µl del buffer de lisis adjunto en el kit durante 10 min en hielo. A continuación la actividad de caspasa-3 fue cuantificada incubando las muestras con 10 µl del sustrato peptídico *Ac-DEVD-pNA* durante 3 h a 37 °C.

Análisis de la morfología Tumoral.

Para el análisis del área tumoral los cortes fueron teñidos con HE y se analizó la relación entre área necrótica y área viable.

Se realizaron estudios morfológicos de la vascular mediante la utilización del marcador de vasos CD34 por inmunohistoquímica (IHQ). Para la técnica inmunohistoquímica se utilizó el sistema del complejo biotina-estreptavidina-peroxidasa (DAB KIT + kit, HRP, Cell Marke). Los cortes fueron hidratados y la actividad de la peroxidasa endógena bloqueada con el agregado de H₂O₂ 0.5% (v/v). Se incubó con el anticuerpo anti CD31, dilución 1:50 *over night* a temperatura ambiente en cámara húmeda. Las imágenes de los tumores fueron digitalizadas y analizadas mediante el programa *Image J*. En cada imagen se analizó el número de vasos por campo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó el ANOVA haciendo las comparaciones con el test Student-Newman-Keuls (para comparaciones múltiples). Los resultados se expresan como la media $\pm$ el desvío estandar.

RESULTADOS

Crecimiento Tumoral

Como primer paso se realizó el análisis del crecimiento tumoral. Observamos que el tratamiento con IL- δ produjo una disminución de la velocidad de crecimiento respecto a los animales que fueron inyectados con solución salina (figura 1).

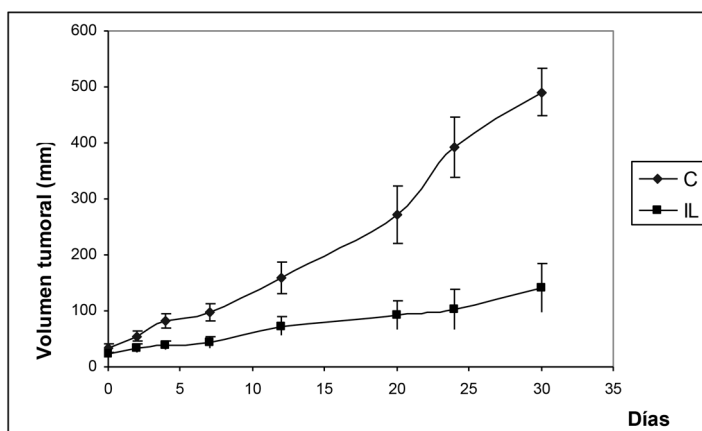


Figura 1: Análisis del volumen tumoral normalizado respecto al volumen inicial de cada tumor. Los animales fueron inyectados diariamente con solución salina o con 10 μ g de IL- δ por animal durante 30 días. Los datos se expresan como la media $\pm$ ES. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus control de tres experimentos independientes.

Proliferación Celular

Para estudiar el efecto de la IL- δ sobre la proliferación celular se analizó la expresión de dos proteínas relacionadas con este evento: El antígeno de proliferación celular (PCNA) y P27/Kip1.

En la figura 3 se muestran los resultados obtenidos luego de la administración diaria de IL- δ durante 18 días. El tratamiento con IL- δ produjo una disminución significativa del 25 % en la expresión de PCNA y un aumento del 22 % de P27 luego de 18 días de tratamiento respecto al grupo control (** $p < 0.01$).

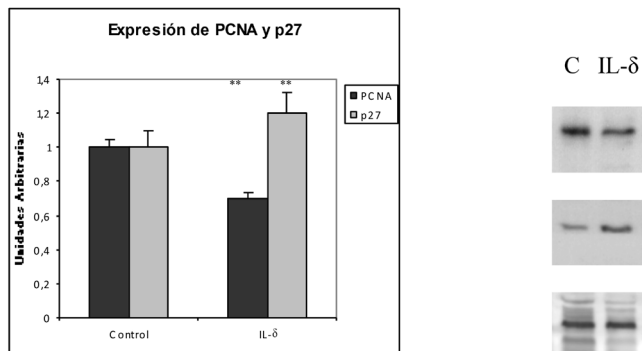


Figura 3: Efecto de la IL sobre la expresión de PCNA y p27 luego de 18 días de tratamiento. Los valores obtenidos del análisis de las autorradiografías están expresados en unidades densitométricas arbitrarias. ** $p < 0,01$ IL- δ vs control. Los datos se expresan como la media $\pm$ ES de 3 experimentos independientes.

Análisis de la muerte por apoptosis

Se analizó la muerte celular programada cuantificando la actividad de caspasa-3 luego de 18 días de tratamiento con IL- δ . Los resultados se encuentran representados en la figura 2. Tras el agregado de IL- δ encontramos un aumento significativo en la actividad de caspasa-3 comparado con el grupo control (** $p < 0,01$).

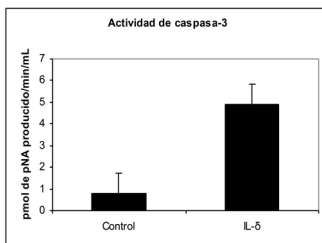


Figura 2: Actividad de caspasa-3 luego de 18 días de tratamiento con IL- δ . La actividad de caspasa-3 se midió como pmol de pNA/min/ml. Los datos se expresan como la media $\pm$ ES de cuatro experimentos independientes (** $p < 0.01$ versus control).

Análisis de la morfología Tumoral.

Del análisis de las tinciones con hematoxilina y eosina observamos que el tratamiento con IL- δ durante 30 días produjo una disminución significativa del área necrótica respecto al área viable (figura 4).

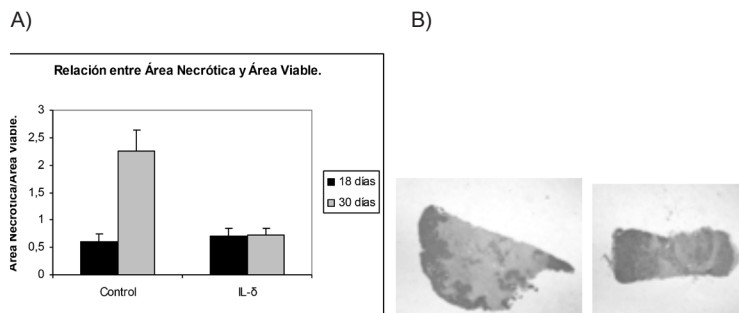


Figura 4: Análisis del área tumoral. A) Se cuantificó la relación entre área necrótica y área viable (an/av). B) Fotos representativas de las morfologías tumorales de ratones control (a) y ratones tratados 30 días con IL δ (b). (** $p < 0.01$ IL- δ versus control luego de 30 días de tratamiento). Los tumores fueron fijados en buffer formol al 10% pH 7.0, incluidos en parafina y las secciones fueron teñidas con hematoxilina-eosina.

Por último se analizó la densidad de microvasos (MVD) luego de 18 y 30 días de tratamiento con IL- δ . Para visualizar los vasos se utilizó el anticuerpo *anti-CD 31*. La medida de la MVD mostró una disminución no significativa luego del tratamiento con IL- δ durante 18 y 30 días (figura 5).

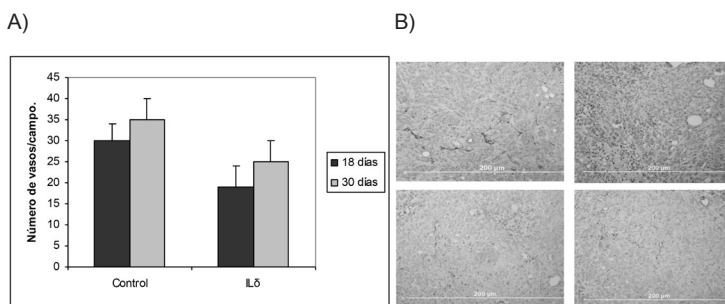


Figura 5: (a) Inmunohistoquímica para CD 31. Se cuantificó el número de vasos por campo de las áreas viables luego de 18 y 30 días de tratamiento. B) Fotos representativas de la inmunohistoquímica a) control 18 días, b) IL δ 18 días, c) control 30 días, d) IL δ 30 días.

DISCUSIÓN:

Resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que la IL- δ no sólo previene el desarrollo del bocio cuando se administra simultáneamente con el bociógeno, sino que produce la involución del bocio preformado en ratas (Pisarev et al., 1988 y 1994). Además, como describimos previamente, la IL- δ inhibe el crecimiento en líneas celulares de diferente origen (Rosner et al, 2010), motivo por el cual se decidió analizar el efecto de la IL- δ sobre el crecimiento tumoral in vivo, en ratones nude portadores de tumores.

El crecimiento tumoral se encontró disminuido para los animales que recibieron el tratamiento con IL- δ . Al estudiar los mecanismos involucrados en la regulación del crecimiento tumoral obtuvimos una disminución en la expresión del marcador de proliferación celular PCNA y un aumento de P27. El antígeno nuclear de proliferación celular es un componente esencial de la maquinaria de replicación celular, es una proteína requerida para las actividades de la ADN polimerasa δ/ϵ que aumenta su expresión durante la fase S del ciclo celular. La inhibición en la expresión de PCNA por parte de IL- δ podría deberse a que las células tratadas con IL- δ se encuentran quiescentes o senescentes.

Pero además se observó que la IL- δ induce la muerte por apoptosis reflejado por el aumento en la actividad de caspasa-3. Estos resultados estarían mostrando que la IL- δ además de inhibir la proliferación celular, induce la muerte por apoptosis.

El mecanismo a través del cual la IL- δ estaría inhibiendo el crecimiento tumoral aún no ha sido dilucidado, motivo por el cual comenzamos a analizar el efecto de la IL- δ sobre la angiogénesis. Observamos que la IL- δ disminuyó la densidad de microvasos, pero dado que esta disminución no fue significativa, nos proponemos continuar y profundizar los estudios acerca del efecto de la IL- δ sobre la angiogénesis.

De acuerdo a los resultados citados concluimos que la IL- δ es capaz de disminuir la velocidad del crecimiento tumoral en la línea de cáncer de colon HT-29 en un modelo "in vivo" inhibiendo la proliferación celular, a la vez que induce la muerte por apoptosis. Estos resultados preliminares podrían sugerir la posibilidad de utilizar a la IL- δ en combinación con otras drogas para el tratamiento del cáncer de colon.

RESUMEN

Introducción: El iodo es utilizado por la glándula tiroides para sintetizar hormonas tiroideas y lípidos iodados. De ellos se han identificado y caracterizado dos: la 6-iodo-delta lactona (IL- δ) y el 2-iodohexadecanal (2-IHDA) que inhiben varios parámetros tiroideos. **Objetivo:** estudiar el efecto de IL- δ sobre el crecimiento de las células HT-29 en un modelo in vivo, así como dilucidar los mecanismos involucrados en este proceso. **Metodología y Resultados:** Los estudios se realizaron en ratones *NIH-nude* los cuales fueron implantados con 1.000.000 de células HT-29. Los ratones portadores de tumores fueron inyectados diariamente con 10 μ g de IL- δ durante 30 días. Observamos que el tratamiento con IL- δ produjo una disminución significativa de la velocidad de crecimiento tumoral respecto al grupo control ($p < 0.01$). La IL- δ produjo una inhibición en la expresión de PCNA del 25% ($p < 0.01$) y un aumento del 17 % en la expresión de p27kip1 ($p < 0.05$), proteínas involucradas en la proliferación celular. Se analizó la muerte por apoptosis mediante la cuantificación de la actividad de caspasa-3. Tras el agregado de IL- δ encontramos un aumento de 3.5 veces en la actividad de caspasa-3 ($p < 0.01$). Al estudiar la morfología tumoral observamos que el tratamiento con IL- δ durante 30 días produjo una disminución del área necrótica respecto al área viable ($p < 0.01$) mientras que la densidad de microvasos (MVD) no disminuyó significativamente. **Conclusiones:** la IL- δ disminuye la velocidad de crecimiento tumoral inhibiendo la proliferación celular, a la vez que induce la muerte por apoptosis.

SUMMARY

6-iodo delta lactone (IL- δ) an iodinated arachidonic acid derivative, is one of the iodolipids biosynthesized by the thyroid. Although IL- δ regulates several thyroid parameters such as cell proliferation and goiter growth it was found that this iodolipid inhibit the growth of other non thyroid cancer cell lines such as HT-29 colon carcinoma cells. The aim of this study was to evaluate the anti-neoplastic effect of IL- δ and also study the cellular pathways involved in this process. In the present study, we observed that IL- δ potentially inhibited the in vivo growth of HT-29 xenografts resulting in tumor regression. We found that treatment with IL- δ caused a significant decrease of PCNA expression and an increase in p27 expression. We also show evidences of the pro-apoptotic

effect of IL- δ . Then immunohistochemistry for CD31 was performed to evaluate microvessel density (MVD). The average of MVD did not differ between treatments and there was no clear relationship between MVD measurement and tumor regression. In summary our results demonstrate that IL- δ inhibited the in vivo growth of HT-29 xenografts and induced apoptosis, and opens the possibility that IL- δ could be a potential useful chemotherapy agent.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arroyo-Helguera O, Anguiano B, Delgado G, Aceves C, Uptake and anti-proliferative effect of molecular iodine in the MCF-7 breast cancer cell line. *Endocr. Relat. Cancer* 13:1147-1158, 2006.
2. Boeynaems, J.M, Hubbard, W.C. Transformation of arachidonic acid into an iodolactone by the rat thyroid, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 9001-9004.
3. Chazenbalk G, Pisarev MA, Krawiec L, Juvenal GJ, Burton G, Valsecchi RM. In vitro inhibitory effects of an iodinated derivative of arachidonic acid on calf thyroid. *ActaPhysiol Pharmacol Latinoam* 34:367-373, 1984.
4. Freinkel N & Ingbar SH. The metabolism of ^{131}I by surviving slices of rat mammary tissue. *Endocrinology* 1956;58:51-56
5. Nuñez Anita R. E, Arroyo-Helguera A. O, Cajero-Juárez M, López-Bojorquez L, Aceves C, Complex between 6-iodolactone and the peroxisome proliferator-activated receptor type gamma may mediate the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer, *Prost. Lipid Med.* 89:34-42, 2009.
6. Panneels, V., Van den Bergen H., Jacoby, C., Braekman, J.C., Van Sande, J., Dumont, J.E., Boeynaems, J.M. Inhibition of H_2O_2 production by iodoaldehydes in cultured dog thyroid cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 1994 (a), 102:167-176.
7. Panneels, V., Van Sande, J., Van den Bergen H., Jacoby, C., Braekman, J.C., Dumont, J.E., Boeynaems, J.M. Inhibition of human thyroid adenyl cyclase by 2-iodoaldehydes. *Mol. Cell Endocrinol.* 1994 (b), 106, :41-50.
8. Pisarev M.A, Bocanera L.V, Chester H.A, Kleiman de Pisarev D.L, Juvenal G.J, L.B. Pregliasco, L. Krawiec, Effect of iodoarachidonates on thyroid FRTL-5 cells growth, *Horm. Metab. Res.* 24:558-561, 1992.
9. Pisarev MA, Chazenbalk GD, Valsecchi RM. Thyroid autoregulation. Inhibition of goiter growth and of cAMP formation in rat thyroid by iodinated derivatives of arachidonic acid. *J. Endocrinol. Invest* 1988;1:669-674.

10. Pisarev MA, Krawiec L, Juvenal GJ. Studies on the goiter inhibiting effects of iodolactones. *Eur. J. Pharmacol.* 1994;258:33-37.
11. [Rösner H1](#), [Torremante P](#), [Möller W](#), [Gärtner R](#). Antiproliferative/cytotoxic activity of molecular iodine and iodolactones in various human carcinoma cell lines. No interfering with EGF-signaling, but evidence for apoptosis. [Exp Clin Endocrinol Diabetes.](#) 2010 Jul;118(7):410-9

ESTUDIO DE REGULADORES DEL CICLO CELULAR DURANTE EL ESTABLECIMIENTO DE LA PREÑEZ. SU REGULACIÓN POR RECEPTORES ESTEROIDEOS Y ERK1-2 ACTIVADA; Y SU PARTICIPACIÓN EN LA IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA Y EL DESARROLLO DE LA DECIDUA EN RATAS.

Griselda Vallejo, Ana Cecilia Mestre-Citrinovitz, Patricia Saragüeta
Laboratorio de Regulación Hormonal del Tracto Reproductivo Femenino,
Instituto de Biología y Medicina Experimental

El endometrio experimenta etapas de proliferación, diferenciación y remodelamiento de manera cíclica, preparándose para recibir al blastocisto. Estos cambios están gobernados por la progesterona y el estradiol, siendo la primera esencial para la implantación. Una de las reacciones estromales más importantes en roedores es el proceso de decidualización. La proliferación de las células estromales es seguida de su diferenciación hacia células deciduales, y estos procesos fisiológicos son gobernados por la progesterona y el estradiol. Mientras que la proliferación estromal previa a la implantación embrionaria aumenta en respuesta a progesterona, y se potencia con el estradiol (Revisado por Lee y De Mayo, 2004), la proliferación estromal durante la etapa de diferenciación post-implantatoria depende exclusivamente de progesterona (Ogle, 1998). Si bien la proliferación estromal es fundamental en el desarrollo de la decidua y la formación de decidua es indispensable para lograr una preñez exitosa, los estudios sobre la proliferación endometrial en roedores se enfocaron principalmente en el epitelio. Se determinó que la expresión de las ciclinas D1, D3, A y E y el aumento en la actividad de cdk4, 5 y 6, están asociados a la proliferación epitelial dependiente de estradiol (Altucci, 1997). La progesterona inhibe la proliferación estradiol-dependiente mediante la inactivación del complejo ciclina E/cdk2, inhibición de la expresión de ciclina A, y la retención de ciclina D1 en el citoplasma (Tong, 1999; Chen, 2005). Los estudios relacionados con la proliferación estromal post-implantatoria revelaron que la expresión de ciclina D3 y cdk4 aumenta en las células estromales en proliferación en el sitio de implantación, mientras que su disminución acompañada del aumento de cdkn1a/p21 coincide con el proceso de diferenciación de estas células (Tan, 2002). El factor de transcripción Usf1 regula la expresión de reguladores del ciclo celular como p53, Cdk1 y

Ciclina b1. Cdk1 es la subunidad quinasa del complejo Ciclina b1-Cdk1, cuya activación promueve la entrada a la fase mitótica del ciclo celular (Lindqvist, 2007). La actividad y localización de CDK1 está regulada por la fosforilación específica de residuos treonina y tirosina, y la defosforilación de los residuos Thr14 y Tyr15 por CDC25 (Fisher, 2012). A su vez, CDC25 es activada por fosforilación vía ERK1-2. Si bien la activación de CDC25 por ERK1/2 se describió in-vitro e in-vivo en oocitos de *Xenopus* y en la línea de cáncer de ovario A2780 (Wang, 2007), estos hallazgos sugieren una interrelación entre la señalización de las quinasas ERK1/2 y CDK1 plausible en endometrio. Si bien la utilización de modelos de ratones transgénicos evidenció que el proceso de decidualización es necesario para el establecimiento de la preñez y permitió identificar moléculas claves implicadas en este proceso, como el receptor de progesterona A (Lydon, 1995), ciclooxigenasa 2 (Lim, 1997) y el gen homeobox A10 (HOXA 10) (Satokata, 1995), existe escasa información acerca de las cascadas de señalización que dirigen el proceso decidual mediado por el receptor de progesterona. Previamente reportamos que la expresión del receptor de progesterona (RP), del receptor de estradiol (RE) α y la activación de Erk1-2 aumentan hacia el octavo día de preñez, y que la activación de Erk1-2 promueve la extensión de la decidua (Vallejo, 2011). Este trabajo se centró en el estudio de reguladores del ciclo celular, en particular el factor de transcripción USF1 y sus genes blanco Cdk1 durante la proliferación asociada a

los últimos estadios del desarrollo de la decidua in-vivo, su regulación mediada por los receptores de progesterona y estradiol, y la activación de Erk1-2.

Analizamos la expresión proteica del factor de transcripción USF1, de su gen blanco CDK1 y del marcador de proliferación PCNA en sitios de implantación de 8 días de preñez y en muestras de útero de ratas no preñadas in-vivo mediante inmunoblot. La expresión del factor de transcripción USF1 disminuyó en sitios de implantación de 8 días post coito (dpc) respecto a muestras de útero de ratas no preñadas (-4 ± 0.3 veces de cambio sobre úteros no preñados, $P < 0.05$). Contrariamente, la expresión de CDK1 aumentó en los sitios de implantación 8dpc (3.7 ± 0.9 veces de cambio sobre úteros no preñados, $P < 0.01$). La disminución de USF1 y el aumento de CDK1 se correlacionó con un aumento significativo de PCNA en los sitios de 8 días de preñez respecto a los úteros no preñados ($P < 0.001$). Dado que el factor de transcripción USF1 y su gen blanco CDK1 presentaron un comportamiento opuesto durante el establecimiento de la preñez, extendimos nuestro análisis y estudiamos la expre-

sión de éstas moléculas en el periodo periimplantatorio a los 2, 4, 6 y 8dpc. La cinética de expresión de USF1 y CDK1 mostró que la expresión de USF1 fue máxima a los 2 días post coito (dpc) (2dpc:0,36±0,05; 6dpc:0,09±0,01; 8dpc:0,09 unidades arbitrarias (UA)), mientras que CDK1 aumentó a los 6 y 8 dpc (2dpc:0,24±0,01; 6dpc:0,32±0,07; 8dpc:0,48 UA). El aumento de CDK1 concomitante con la disminución de USF1 sugiere que, de existir alguna relación entre ellos, sería una consecuencia tardía de USF1 sobre la inducción y acumulación de CDK1. Analizamos el patrón de expresión de USF1, CDK1 y PCNA en los sitios de implantación 8 dpc. USF1 presentó un patrón de expresión uniforme en la decidua antimesometrial (AM) y una localización nuclear y citoplasmática. Las células estromales indiferenciadas de la zona de unión entre las deciduas antimesometrial y mesometrial (M) y del estroma adyacente al miometrio que bordea la decidua antimesometrial mostraron una tinción nuclear positiva y uniforme. Por el contrario, CDK1 presentó un patrón de expresión regionalizado. Determinamos tinción positiva nuclear en la decidua mesometrial, y en las células estromales indiferenciadas de la zona de unión entre las deciduas AM-M. En las células estromales indiferenciadas del estroma adyacente al miometrio que bordea la decidua antimesometrial observamos que las células en contacto con la decidua poseían una fuerte señal nuclear positiva mientras que las células en contacto con el miometrio eran negativas. Las células de la decidua antimesometrial presentaron señal positiva citoplasmática y perinuclear. La fuerte tinción de las células estromales indiferenciadas que bordean la decidua AM y de la zona de unión AM-M fue semejante al patrón observado para Erk1-2 fosforilada que reportamos previamente (Vallejo y col., 2011). Corroboramos que ERK1-2 activada y CDK1 poseían un patrón de expresión similar realizando perfiles de la intensidad de la señal a lo largo del sitio de implantación. La localización de PCNA fue nuclear a lo largo de todo el sitio de implantación. Analizamos la participación del receptor de progesterona (RP), del de estradiol (RE), y de la interacción RP-RE en la regulación de USF1 y CDK1 asociada al marcador de proliferación PCNA. Las ratas preñadas se inyectaron subcutáneamente los días 6 y 7 pc con el antagonista del receptor de progesterona (onapristona), del receptor de estradiol (ICI 182780) o la combinatoria de ambos y se sacrificaron al 8vo. día de preñez. Los experimentos de preñez en presencia de los antagonistas muestran que la interrupción de la señalización del RP, del RE o ambos redujo significativamente la expresión de CDK1 en los sitios de implantación de 8 días de preñez, así como la expresión del marcador de proliferación PCNA, mientras que no modificó la expresión de USF1. Estudiamos la modulación del patrón de expresión de

CDK1 mediada por la señalización dependiente del receptor de progesterona y de estrógeno, asociada a la expresión del marcador de proliferación PCNA. Nuestro objetivo fue determinar a qué tipo celular está asociada la expresión de CDK1 remanente del bloqueo del RP y RE mediante inmunohistoquímica, y si existía una señalización diferencial asociada al RP o al RE dependiente del tipo celular que componen el sitio de implantación. El tratamiento con la anti-progestina (ONA) redujo la señal positiva para CDK1 localizada en las células estromales en contacto con el borde de la decidua antimesometrial e inhibió la señal perinuclear presente en las células deciduales del antimesometrio. Por el contrario, el tratamiento con el antiestrógeno (ICI) inhibió la tinción nuclear que observábamos en las células estromales que rodean la decidua y no modificó la señal perinuclear presente en las células deciduales. Por otro lado, ambos antagonistas disminuyeron la expresión de PCNA en todo el sitio de implantación, exceptuando en el borde de la decidua antimesometrial de las ratas tratadas con onapristona, donde se observan zonas discretas de señal positiva. En presencia de ambos antagonistas se recuperó parcialmente la señal de CDK1 nuclear y de PCNA en el borde de la decidua. Resultados preliminares de experimentos en curso sugieren que la administración intrauterina del inhibidor de ERK1-2 PD 98059 al 6to día de preñez disminuye los niveles de CDK1 presente en los sitios de implantación 8dpc.

Nuestros resultados demuestran por primera vez que la quinasa moduladora del ciclo celular CDK1 se regula durante el periodo peri implantatorio y que su expresión depende de la activación de los receptores de progesterona y de estradiol. Además sugieren una regulación diferencial de CDK1 dependiente del tipo celular mediada por el RP y el RE en el estroma antimesometrial. Mostramos que existe una correlación entre la cinética de expresión y la localización de CDK1 y ERK1/2 activada, lo cual sugiere una interrelación entre la activación de estas quinasas relevante en la proliferación asociada a la extensión decidual. Tomados en conjunto, nuestros hallazgos sugieren la participación de CDK1 en la proliferación asociada a los últimos estadios del desarrollo de la decidua.

ABSTRACT

The endometrium undergoes cyclic changes of proliferation, differentiation and remodelling, preparing to receive the implanting blastocyst. Endometrial stromal cells proliferate and subsequently differentiate into the

decidual phenotype, both physiological processes governed by progesterone and estradiol. Studies have mainly focused on the molecules mediating ovarian hormones regulated epithelial proliferation, while the molecular players involved in the proliferation of the stromal compartment have been less explored. Previously we reported that Erk activation is associated to cell proliferation in antimesometrial and mesometrial decidual tissues in rat implantation sites at 8 days of pregnancy, which also depends on ligand-free PR and ER signalling. Here we show that the transcription factor USF1 and CDK1, its cell cycle regulator target, are oppositely regulated during pregnancy. USF1 expression is increased in non-pregnant uterus samples, while CDK1 is induced in 8dpc implantation sites concomitantly with the DNA marker synthesis PCNA. Progesterone receptor (PR) and/or estrogen receptor (ER) antagonist treatments did not modified USF1 protein levels but significantly reduced CDK1 and PCNA expression in 8dpc implantation sites. USF1 showed a uniform expression pattern throughout the antimesometrial decidua, while CDK1 revealed a regionalized expression pattern. CDK1 was cytoplasmic in the antimesometrial decidua, with positive perinuclear signal, while the border of the decidua showed nuclear staining. This expression pattern resembles the localization of pERK1-2 recently reported (Vallejo et al., 2011). PCNA localization was nuclear throughout the whole implantation site. Anti-progestin treatment reduced the positive CDK1 signal from the stromal cells surrounding the antimesometrial decidua and blocked CDK1 expression on antimesometrial decidual cells. Antiestrogen administration inhibited CDK1 expression at the border of the antimesometrial decidua and did not modify CDK1 levels in the decidua itself. These findings suggest a cell-type specific role of PR and ER signaling on CDK1 expression. Our results show that the in vivo proliferation associated to the last stages of decidua development could be a consequence of USF1 decrease and CDK1 increment in association with ERK1-2 activation.

REFERENCIAS

1. Altucci L et al. 1997 Estrogen induces early and timed activation of cyclin-dependent kinases 4, 5, and 6 and increases cyclin messenger ribonucleic acid expression in rat uterus. *Endocrinology*. 138(3):978-84.
2. [Chen B](#) et al. 2005 Progesterone inhibits the estrogen-induced phosphoinositide 3-kinase-->AKT-->GSK-3beta-->cyclin D1-->pRB path-

- way to block uterine epithelial cell proliferation. [Mol Endocrinol.](#) 19(8):1978-90.
3. Fisher D et al. B. 2012 Phosphorylation network dynamics in the control of cell cycle transitions. *J Cell Sci.* 125(Pt 20):4703-11.
 4. Lee KY, DeMayo FJ. 2004 Animal models of implantation. *Reproduction.* 128(6):679-95.
 5. Lim H et al. 1997 Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase-2 deficient mice. *Cell.* 91:197-208.
 6. Lindqvist A et al. 2007 Cyclin B1-Cdk1 activation continues after centrosome separation to control mitotic progression *PLoS Biol.* 5 (5):e123.
 7. Lydon JP et al. 1995 Mice lacking progesterone receptors exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes and Development.* 9:2266-78.
 8. Ogle TF et al. 1998 Progesterone and estrogen regulation of rat decidual cell expression of proliferating cell nuclear antigen. *Biol Reprod.* 59 (2):444-50.
 9. Satokata I et al. 1995. Sexually dimorphic sterility phenotypes in Hoxa10-deficient mice. *Nature* 374(6521):460-3.
 10. Tan J et al. 2002 [Evidence for coordinated interaction of cyclin D3 with p21 and cdk6 in directing the development of uterine stromal cell decidualization and polyploidy during implantation.](#) *Mech Dev.* 111(1-2):99-113.
 11. Tsuda H et al. 2003 Alteration of G2 cell cycle regulators occurs during carcinogenesis of the endometrium. *Oncology.* 65(2):159-66.
 12. Tong W et al. 1999 Progesterone inhibits estrogen-induced cyclin D1 and cdk4 nuclear translocation, cyclin E- and cyclin A-cdk2 kinase activation, and cell proliferation in uterine epithelial cells in mice. *Mol Cell Biol.* 19(3):2251-64.
 13. Vallejo G et al. 2011 Ovarian Steroid Receptors and Activated MAPK in the Regional Decidualization in Rats. *Biology of Reproduction.* *Biol Reprod.* 84(5):1063-71.
 14. Wang R et al. 2007 Regulation of Cdc25C by ERK-MAP kinases during the G2/M transition. *Cell* 128(6):1119-32

CADHERINA EPITELIAL Y SU RELACIÓN CON LA PROGRESIÓN TUMORAL. EVALUACIÓN DE LAS ALTERACIONES EN SU EXPRESIÓN Y ESTRATEGIAS PARA LA DETECCIÓN DE NUEVOS MODULADORES EN EL CÁNCER DE ENDOMETRIO

Dra. Mónica Vazquez-Levin, Lic. Marina Rosso, Lic. María José Besso, Lic. María Florencia Abascal, Dra. Lara Lapyckyj, Dra. Evangelina Aparicio.
Instituto de Biología y Medicina Experimental. Consejo Nacional de Investigaciones Científico y Técnicas de la Argentina (IBYME-CONICET). Vuelta de Obligado 2490.
Buenos Aires. Argentina

CÁNCER DE ENDOMETRIO

El **cáncer de endometrio (CE)** presenta alta incidencia y prevalencia a nivel global (8,2% de la incidencia de cáncer en mujeres en el mundo; 300.000 nuevos casos c/año). En la mayoría de los casos, los tumores son carcinomas y se subdividen en 1) tipo I/endometroide (bajo grado y estadio al momento de la presentación de la enfermedad; asociados a un buen pronóstico cuando se tratan con la terapia adecuada) y 2) tipo II/no-endometroides (alto grado histológico y estadio al momento del diagnóstico, pronóstico pobre, probabilidad de metástasis y recurrencia a pesar de intervenciones clínicas agresivas). El CE tipo endometroide representa hasta el 80% de los diagnósticos de CE y algunos tipos (IA y IB; 1A en la clasificación actual FIGO) son tratados con histerectomía con/sin tratamiento adyuvante, y sobrevida a 5 años de ~96 %. Sin embargo, hasta el 30% de los casos son diagnosticados en etapas avanzadas de la enfermedad, cuando las células tumorales invaden el miometrio (tipo IC, tipo 1B nueva clasificación) y/o nódulos linfáticos. Estos casos presentan un pronóstico pobre, se observa un aumento en la tasa de recurrencia post-quirúrgica y disminución en la sobrevida a 5 años.

Actualmente, la determinación de CE se hace por examinación de biopsia endometrial seguido de evaluación histológica por un patólogo especialista. Esta estrategia estándar presenta limitaciones y desventajas dado que es un procedimiento invasivo (hay que acceder al órgano para su evaluación), subjetivo (depende enteramente del criterio del anatómo patólogo) y poco sensible (requiere la presencia de una masa tumoral para ser detectado). La **histeroscopia** puede contribuir en determinados casos de CE a esclarecer el diagnóstico, pero no da información sobre cambios moleculares del proce-

so cancerígeno. Es por ello que existe la necesidad de desarrollar métodos de diagnóstico precoz de esta enfermedad de alta sensibilidad/especificidad, para la elección de la estrategia de tratamiento adecuado y para la calidad de vida y supervivencia de las pacientes. A pesar de la caracterización de algunos eventos asociados al CE, las bases moleculares de esta patología, en gran parte, son aún desconocidas.

Adhesión celular y Cadherina epitelial

La adhesión celular desempeña es clave en el mantenimiento de la homeostasis tisular y se altera en la progresión tumoral; ocurren cambios en los niveles de expresión de moléculas de adhesión, que favorece la adquisición de capacidades migratorias/invasivas por parte de las células tumorales, la diseminación local y a distancia. Este proceso recibe el nombre de Transición Epitelio-Mesenquimal (TEM), tiene lugar en el desarrollo embrionario y ha sido descrito en procesos patológicos. Se caracteriza por la pérdida de polaridad celular, desestabilización de la adhesión célula-célula, expresión de marcadores mesenquimales y adquisición de capacidades celulares migratorias e invasivas. En este contexto, cobra especial importancia la molécula de adhesión **Cadherina Epitelial (CadE)**, responsable del establecimiento y mantenimiento de las uniones adherentes principalmente entre células epiteliales.

CadE es una proteína transmembrana de único paso, principalmente expresada en las células epiteliales, que media la unión intercelular de manera homofílica dependiente de Ca^{2+} , formando parte de las uniones adherentes. CadE ha sido involucrada en numerosos procesos, destacándose su rol en el desarrollo embrionario, la morfogénesis y mantenimiento de la polaridad ápico-basal en los tejidos, preservando la supervivencia del epitelio y controlando su proliferación.

CadE humana está codificada por el gen **CDH1** en el cromosoma 16q22.1, y está formado por 16 exones y 15 intrones (~100 kb). El gen se transcribe como un único ARN mensajero (ARNm) funcional y codifica para una proteína formada por 1 dominio extracelular (con 5 dominios cadherinas en tándem), 1 dominio transmembrana y 1 dominio intracelular. El dominio extracelular participa en las uniones intercelulares y el citoplasmático está involucrado en la transducción de señales y tiene un sitio de unión con la β -catenina que conecta a CadE con el citoesqueleto de actina.

CadE es un **SUPRESOR TUMORAL** dado que las alteraciones en su expresión/funciones se asocian de manera inversa a la agresividad del

tumor. La disminución/ausencia de CadE ha sido documentada en numerosos tumores y ha sido asociada a 1)mutaciones en *CDH1*, 2)pérdida de un alelo del gen, 3)represión transcripcional y 4)modificaciones post-transduccionales de la proteína.

Alteraciones en CadE se asocian a cambios en la expresión/localización de β -**catenina** y en la expresión génica con activación de mecanismos de proliferación celular y adquisición de motilidad/invasión celular. Se pierden marcadores epiteliales (ej. citoqueratinas) y se expresan marcadores mesenquimales (ej. **Vimentina**). Con la disminución de CadE además se activa la expresión de otras cadherinas como **Cadherina neural (CadN)** y **Cadherina placentaria (CadP)**, como parte de un proceso conocido como “**switch**” de cadherinas y relacionado con la transición de un fenotipo tumoral benigno hacia uno invasivo/maligno y metastásico. Se expresan factores de transcripción asociados a la represión de la expresión de CadE que facilitarían la invasión y la metástasis promoviendo la afinidad de las células tumorales por las células endoteliales y del estroma. En el año 2002 se describió un nuevo modulador negativo de CadE asociada a la TEM, denominado **Disadherina**; su presencia fue asociada a los efectos fenotípicos asociados a adquisición de invasividad y metástasis.

Un fenómeno que ha cobrado gran relevancia en el cáncer es el “**splicing**” alternativo que da lugar a transcritos codificantes de isoformas proteicas con funciones antagonistas. El “**splicing**” alternativo se ha propuesto como uno de los nuevos mecanismos de regulación de la progresión tumoral. Estudios recientes han confirmado que este fenómeno sucede durante la TEM. Más aún, la expresión de factores que regulan el “**splicing**” alternativo se encuentra alterada durante la TEM. En años recientes, se ha descrito este fenómeno en el procesamiento del ARNm de CadE en células tumorales, que lleva al ensamblaje de un transcrito que excluye el exón 11. Su expresión en el CE *aún no ha sido reportada*.

Cadherina epitelial y Cáncer de Endometrio

En el CE se ha reportado disminución de la expresión de CadE (mayormente por inmunohistoquímica), que se correlaciona con un pronóstico adverso y menor sobrevida. En relación a las alteraciones de CadE en el CE, se han detectado niveles de expresión aumentados de varios represores transcripcionales de CadE en el frente invasivo de tumores de endometrio. Además, se han asociado los factores de transcripción Ets con la activación de proteasas que degradan matriz extracelular. En particular, un aumento en

la expresión de ETV5 ha sido asociado con las etapas iniciales de la invasión miometrial en el EC, en correlación con un incremento de la metaloproteínasa 2 (MMP2).

Con el interés de profundizar en la comprensión de las bases moleculares del CE y, en particular, sobre las alteraciones asociadas a CadE en esta patología, se realizaron una serie de estudios que comprendieron:

1) Estudios *in silico*: Se realizó un análisis bioinformático “*text y data mining*” (herramientas DisGeNET y Cytoscape) para hacer un relevamiento sistemático de la literatura y evaluar la relación gen-enfermedad entre la neoplasia endometrial y el gen *CDH1*/CadE.

2) Estudios en muestras de tejido endometrial de pacientes diagnosticadas con CE (y controles): Se evaluó la expresión del ARN y proteína de CadE (inmunohistoquímica y PCR cuantitativa en tiempo real) en muestras de endometrio de pacientes diagnosticadas con CE en diferentes estadios de la enfermedad.

3) Estudios en modelos *in vitro* en líneas celulares establecidas de CE: Se evaluó la expresión de CadE y moléculas relacionadas en un modelo *in vitro* de CE, de células Hec-1a e Ishikawa transfectadas con ETV5 y control (plásmido sin inserto).

4) Estudios en modelos *in vitro* de cultivos celulares primarios derivados de tejido no tumoral de endometrio humano Se implementaron cultivos primarios de epitelio y estroma no tumoral, para la evaluación de CadE y moléculas relacionadas.

RESULTADOS

1) Estudios *in silico*

Se identificaron 141 términos correspondientes a patologías asociadas a *CDH1*. Del total, 110 se encontraron relacionados con neoplasias, de las que 20 fueron propiedades tumorales, 83 tumores sólidos, 4 procesos neoplásicos y 3 tumores no sólidos.

El análisis sobre bases curadas generó una red de 29 nodos; “*Endometrial neoplasm*” fue uno de los nodos identificados. *CDH1*/CadE se encontró

entre los principales genes asociados a CE, clasificado “biomarcador”. El estudio permitió identificar 34 genes asociados a la enfermedad cuya relación con *CDH1* aún no fue reportada. Empleando herramientas bioinformáticas de redes de interacción estructural/funcional, nos encontramos caracterizando un conjunto de genes relacionados a CadE a ser testeados en ensayos bioquímicos y moleculares. Parte de las verificaciones se realizarán con los modelos explicados en las secciones siguientes.

El análisis bioinformático transversal sistemático y objetivo confirmó la asociación de CDH1 con la neoplasia endometrial y llevó a la identificación de otros genes/proteínas relacionados cuyas alteraciones en CE se encuentran actualmente en evaluación.

2) Estudios en muestras de tejido endometrial de pacientes diagnosticadas con CE (y controles)

Por inmunohistoquímica de secciones de endometrio normal en fase proliferativa e hiperplasia compleja con atípías, se observó señal citoplasmática difusa para CadE. Las muestras de tumor endometriode (FIGO IA/grado 1; G-I) presentaron positividad intensa multifocal para CadE; en tumor endometriode estadio FIGO IB, grado 3 se observó marcación focal citoplasmática para CadE de intensidad baja. En cada experimento se incluyó un control negativo (omisión del anticuerpo primario). Una vez completada la etapa de optimización, se obtuvo un conjunto de tejidos no tumorales y tumorales para tener un muestreo de tinción de CadE.

Se realizaron además evaluaciones para cuantificar el transcrito de CadE sobre 44 muestras. En las muestras de tumores de tipo endometriode se observó una tendencia hacia una disminución en los niveles de CadE (expresión relativa de CadE=0,23±0,046; promedio±EEP; unidades arbitrarias), comparados con tejidos no tumorales (0,32±0,099). Esta tendencia se observó en muestras de pacientes con tumores invasivos (expresión en tumores Tipo IC/1B=0,22±0,053).

Los estudios moleculares de detección de CadE revelan alteraciones en el transcrito y proteína de la molécula de adhesión en CE cuando comparado con muestras control.

3) Estudios en modelos in vitro en líneas celulares establecidas de CE

Empleando protocolos de PCR en tiempo real, se detectó disminución de la expresión del ARNm de CadE (60%) en las células Hec1a-ETV5 respecto del control. En concordancia, se observó una señal de menor intensidad para

la proteína CadE (“Western Immunoblotting/inmunocitoquímica”. Los bajos niveles de CadE no se asociaron a niveles incrementados de la variante de “*splicing*” de CadE(CadESkip11).

Las alteraciones en CadE se asociaron a cambios en el transcripto y proteína beta-catenina en células Hec1a-ETV5 respecto del control. Beta-catenina se relocizó al citoplasma en las células Hec1a-ETV5, contrastando con la esperada en contactos célula-célula y observada en las células Hec1a-GFP.

Dado que ETV5 se encuentra implicado en la progresión hacia un fenotipo más invasivo en CE, se evaluaron Vimentina y CadN. Los resultados de estos estudios revelaron 1)expresión de Vimentina y 2)expresión de CadN (“switch” de cadherinas) (“Western immunoblotting” e inmunocitoquímica de fluorescencia) solo en las células Hec1a-ETV5.

La expresión de Disadherina ha sido implicada como regulador negativo de la expresión/función de CadE. Hasta el presente no hay antecedentes de su expresión en el CE. Los ensayos revelaron un aumento (>12 veces) del ARNm de Disadherina en células Hec1a-ETV5 comparado con las células control y la proteína fue detectada en ensayos de “Western immunoblotting”/ inmunocitoquímica solo en las células Hec1a-ETV5.

La disminución de la expresión de CadE observada en las células Hec1a-ETV5 también fue demostrada en las células de CE Ishikawa transfectadas con el factor de transcripción.

En conjunto, la expresión de ETV5 se asocia a un cambio en CadE y beta-catenina, así como a alteraciones en la expresión génica características de la TEM. El estudio describe además, por primera vez, la expresión de Disadherina, un modulador negativo de CadE en el CE.

4) Estudios en modelos in vitro de cultivos celulares primarios derivados de tejido no tumoral de endometrio humano

Se realizaron cultivos celulares de endometrio humano no tumoral. Se optimizó el protocolo de cultivo para un cultivo mixto y enriquecido (glándula/estroma). Los cultivos mixtos presentaron predominancia de células de morfología tipo fibroblástica con niveles altos de expresión de transcripto/proteína vimentina. En los cultivos enriquecidos en glándula, se detectaron niveles de CadE mayores que los correspondientes a estroma. De manera inversa, se encontraron mayores niveles de expresión de Vimentina en los cultivos enriquecidos en estroma.

Los bajos niveles de CadE en el estroma no se asociaron a niveles incrementados de la forma variante de CadE (CadESkip11) en esos cultivos. En

el estroma se detectó la presencia del transcrito codificante del modulador negativo de CadE, Disadherina, en cantidades mayores a las detectadas en los cultivos de glándula (datos no mostrados), por lo que se podría proponer su rol en la regulación negativa de la expresión y funciones de CadE en el estroma endometrial. Los cultivos serán desafiados con agentes que inducen la TEM con el interés de evaluar los cambios en CadE y proteínas relacionadas.

El desarrollo de los estudios realizados confirman las alteraciones en CadE y genes/proteínas asociadas y ha revelado la expresión de moduladores cuya expresión en el CE no había sido reportada hasta el presente. Los estudios serán profundizados para contribuir a la comprensión de las bases moleculares del CE, patología que afecta a muchas mujeres en el mundo.

NOTA:

Los estudios de bioinformática se realizaron en colaboración con la Dra. Laura Furlong, del Research Programme on Biomedical Informatics (GRIB), Hospital del Mar Medical Research Institute (IMIM), Universitat Pompeu Fabra (UPF), Barcelona, España.

Las muestras no tumoral y tumoral de endometrio para inmunohistoquímica fueron cedidas por Dra. Alejandra Wernicke, del equipo de Anatomía Patológica del Hospital Italiano (Buenos Aires, Argentina) quien también nos asistió en la interpretación de la lectura de las tinciones.

Las muestras de ARN/ADNc no tumoral y tumoral de endometrio y los modelos Hec-1a e Ishikawa fueron cedidas por el Dr. Jaume Reventón y su equipo de investigación, del Hospital de Vall d'Hebron, (Barcelona, España) como parte de un proyecto colaborativo apoyado por la Unión Europea (Programa IRSES (International Research Scientific Exchange Staff, Programa 7mo marco Marie Curie)

Las muestras para la realización de cultivos mixtos y enriquecidos de endometrio fueron cedidos por la Lic. Fernanda Raffo, directora del laboratorio de Reproducción Asistida de la clínica Fertilab (Buenos Aires, Argentina).

El uso de las muestras fue previamente aceptado por los comités de ética de todas las instituciones participantes.

DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA INMUNOLÓGICA UTILIZANDO UNA CEPA VACUNAL DE *SALMONELLA* TYPHI ATENUADA, PARA EL TRATAMIENTO DE METÁSTASIS HEPÁTICAS EN UN MODELO MURINO

Autor principal: Dra. Alejandrina Vendrell.

Coautores: Dra. Claudia Inés Waldner.

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)

CONICET-Facultad de Medicina, UBA

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neoplásicas son, hace ya varias décadas, blanco de estudio para los investigadores de ciencias médicas de todo el mundo. Varios tratamientos surgieron de estos estudios, siendo la Cirugía el más ampliamente utilizado. Es conocido también que luego de una cirugía para la extracción de un tumor existe el riesgo de metástasis o recurrencia de la enfermedad ^{4,5}. Para prevenir la aparición de estos focos metastásicos se han usado ampliamente la radioterapia y la quimioterapia ¹⁰, sin embargo, estos tratamientos no son inocuos teniendo un gran efecto deletéreo en la calidad de vida de los pacientes oncológicos. Es por esto, que es menester continuar con la búsqueda de mejores tratamientos para la prevención de las metástasis. Dado que el hígado es un blanco frecuente de metástasis, es de gran importancia buscar la forma de evitar la implantación de células tumorales en este órgano. En varias oportunidades se han utilizado bacterias, como adyuvantes en vacunas antineoplásicas ^{3,9}, ya que inducen una significativa respuesta del sistema inmune. Existen varias investigaciones que proponen el uso de bacterias para tratar los tumores basándose fundamentalmente en su efecto activador sobre Neutrófilos, Células Dendríticas, Linfocitos T, y NK, creando un microambiente tumoral rico en citoquinas y factores quimiotácticos ^{13,14}, favoreciendo de esta manera la detección y la eliminación, por parte del sistema inmune, de las células tumorales. Las bacterias vivas atenuadas por mutaciones dirigidas, son actualmente una valiosa herramienta para el tratamiento de diversas afecciones, ya que inducen gran inmunogenicidad, pueden ser administradas por mucosas, son suficientemente inocuas, y pueden ser utilizadas como vectores para vacunas génicas ². Diferentes autores demostraron que una *Salmonella* Typhimurium atenuada, previno el estable-

cimiento de metástasis hepáticas en modelos murinos ^{7,11}. Por otra parte, nosotros demostramos, que la cepa atenuada de *Salmonella* Typhi, CVD 915 ¹⁵, al ser utilizada como agente inmunoterapéutico por vía subcutánea e intratumoral, estimuló una respuesta inmune específica contra el tumor, y disminuyó el crecimiento tumoral y la incidencia de metástasis, e incluso aumentó la sobrevivencia de los ratones, en dos modelos tumorales murinos ^{13,14}. El Objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la inmunización oral con la cepa bacteriana vacunal, atenuada, de *Salmonella enterica* serovar Typhi CVD 915 sobre el desarrollo de metástasis tumorales de un adenocarcinoma mamario, en un modelo murino de metástasis hepática. Nuestra hipótesis fue que la cepa bacteriana, siendo administrada por vía oral, podría colonizar tejido linfóide asociado al intestino y placas de Peyer, generando una respuesta innata y proinflamatoria en hígado que favorecería a la detección y posterior rechazo, por parte del sistema inmune, de células tumorales y metastásicas en este órgano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo de tumor murino, en los experimentos se utilizó el adenocarcinoma de mama LM3 descrito previamente ¹². La línea LM3 es derivada de un adenocarcinoma mamario murino M3, singéneica en ratones BALB/c y fue cedida gentilmente para ser utilizada en este proyecto por la Dra. Elisa Bal de Kier Joffé, Directora del Área de Investigación del Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo” de Buenos Aires.

Cepa de bacteria: se utilizó la cepa de bacterias Δ *guaBA* *Salmonella enterica* Seroovar Typhi CVD 915 ¹⁵, atenuada por una delección en *guaBA* que interrumpe la síntesis de nucleótidos de guanina. La cepa ha sido gentilmente cedida por el Dr. Myron Levine, CVD, Maryland, USA, para su utilización en este proyecto.

Cepa de ratones: se utilizaron ratones BALB/c hembra de 6-8 semanas, provenientes del Bioterio de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires.

Desarrollo del modelo de metástasis hepática, con las células del adenocarcinoma mamario LM3. Se utilizó un modelo de metástasis hepática basado en el descrito por Lafreniere y Rosenberg ⁸, con algunas modi-

ficaciones, que fue puesto a punto en nuestro laboratorio. Brevemente, se anestesió a los ratones con una combinación de xilacina- ketamina a una dosis de xilacina 10mg/kg y ketamina 100 mg/kg, vía intraperitoneal. Se les exteriorizó el bazo y se les depositó 100.000 células LM3 en 100 µl de medio de cultivo. Pasados 3 minutos, se realizó una esplenectomía.

Respuesta a la inmunización con la *Salmonella Typhi* CVD 915. A un grupo de ratones normales se les administró por la vía orogástrica (o.g.) una suspensión de bacterias CVD 915 a 1×10^9 UFC/0,2 ml (grupo tratado), y a otro grupo se le administró 0,2 ml de PBS via o.g. (grupo control). Para estudiar la respuesta inmune desencadenada a distintos tiempos luego de la inmunización, se sacrificaron animales de ambos grupos (tratado y control) a las 4, 12 y 24 horas post-inoculación para la toma de muestras. La sangre, las placas de Peyer (PP) y los hígados fueron removidos, para ser procesados según correspondiere.

Tratamiento profiláctico de las metástasis hepáticas, mediante la vacunación o.g. con CVD 915. Se les administró a 2 grupos de ratones por vía o.g. 1×10^9 UFC de bacterias en 0,2 ml de PBS, o 0,2 ml de PBS según sean del grupo tratado o control respectivamente. Luego de 24h de la inmunización, los animales fueron desafiados con las células tumorales mediante la cirugía antes descripta. Luego de 21 ± 1 días los ratones fueron sacrificados para la toma de muestras. Los linfonódulos mesentéricos (LNM) y los hígados fueron removidos, para ser procesados según correspondiere. Para evaluar la eficacia terapéutica, se registró el peso total del hígado, por observación con lupa, se cuantificaron el número de metástasis por hígado, y se tomaron el largo y el ancho de cada una. El volumen de las mismas fue determinado con la fórmula del tumor elipsoidal ⁶.

Aislamiento y caracterización de las diversas poblaciones leucocitarias presentes, sangre periférica, bazos, placas de Peyer, LNM e hígados. Las muestras de órganos linfoides tomadas a diferentes tiempos posteriores a la inmunización o el desafío, se disgregaron mecánicamente ¹³. Los hígados, fueron disgregados con émbolo sobre un tamiz. Luego, se aislaron las células inmunes intrahepáticas (CIH) con un gradiente de percoll al 33% ¹. Para la identificación de las poblaciones de las CIH, y de las poblaciones celulares en bazo y en LNM, se realizaron tinción por inmunofluorescencia y análisis por citometría de flujo. Para la caracterización de las molé-

culas de las distintas poblaciones, se incubaron las células con el anticuerpo monoclonal específico (AcM), o el control de isotipo, conjugados a fluorocromo (FITC, PE o APC), y se evaluaron según lo descrito previamente ¹³ la presencia de células expresando marcadores de macrófagos [anticuerpo monoclonal (AcM) anti-F480⁺], de granulocitos (AcM anti-Gr1⁺), de CD (AcM anti-CD11c⁺), de linfocitos T (AcM anti-CD3⁺, AcM anti-CD4⁺ y anti-CD8⁺), de NK (AcM anti-CD49⁺) o de linfocitos B (AcM anti-B220⁺). Las muestras fueron procesadas en un citómetro de flujo FACS Calibur, o un BD Accury.

Quantificación de Citoquinas Para la determinación de citoquinas se realizó la técnica de ELISA ¹³. Se utilizaron como muestras: lisado hígados o sobrenadantes de cultivos primarios de 72-96 h de PP o de CIH.

Análisis estadístico

Los resultados experimentales obtenidos fueron analizados estadísticamente de acuerdo a los test apropiados para el diseño de cada experimento utilizando el programa de procesamiento de datos y estadística: PRISM 5. Se utilizaron análisis paramétricos (t de Student/ANOVA y Post ANOVA Tukey) o no paramétricos (Mann Whitney) según corresponda para cada caso. Para el análisis de los datos obtenidos por citometría de flujo utilizamos el programa Flowing Software.

RESULTADOS

La *Salmonella* CVD 915 inoculada por vía o.g. induce una respuesta innata en el hígado de ratones BALB/c normales. En los estudios preliminares en ratones sanos, detectamos que a 4 horas de la inmunización oral con 1×10^9 UFC de esta bacteria, hay una activación del sistema inmune innato en el hígado, evidenciado por el aumento de los niveles de las citoquinas proinflamatorias, IL-12 y TNF- α , presentes en los lisados de Hígados de animales inmunizados con la bacteria, respecto de los controles (figura 1). Estos resultados indicaron que la CVD 915 por vía o.g. induce una respuesta inmune inflamatoria muy temprana en el hígado.

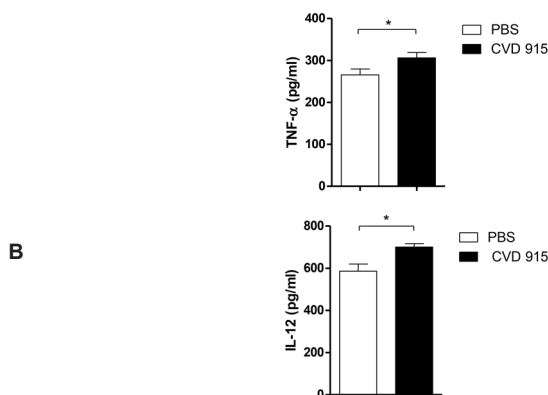


Figura 1. Niveles de TNF- α (A) e IL-12(B) en lisados de hígado a 4 h de la administración o.g. de CVD 915 o PBS como control. N=3 * $p < 0,05$, según el test de Mann Whitney

La inmunización con la *Salmonella*, induce la producción de IFN- γ en placas de Peyer. En cultivos primarios de 72 horas, de células de placas de Peyer (CPP) provenientes de ratones a 12 horas de la administración de la CVD 915, encontramos un aumento en los niveles de TNF- α e IFN- γ en los sobrenadantes de cultivo. En cultivos de CPP a 24 h de la inmunización, encontramos un aumento solo en los niveles de IFN- γ (figura 2). Los resultados encontrados, nos demuestran que la CVD 915 por vía o.g. es capaz de inducir, entre las 12 y 24 h de la inmunización, la secreción de Citoquinas Th1 en placas de Peyer.

La inmunización con la CVD 915 induce un aumento de las poblaciones de células de la inmunidad innata en Bazo. El análisis de las poblaciones celulares de la Sangre y el bazo de ratones inmunizados por vía oral con la *Salmonella* Typhi atenuada 24 horas antes, nos reveló un aumento de la frecuencia de las células CD4⁺ (linfocitos T colaboradores) y una disminución de las B220⁺ (mayormente linfocitos B) (figura 3) circulantes en sangre de animales inmunizados en comparación con los controles; y un aumento significativo de las células NK (CD49⁺) y de neutrófilos (Gr1⁺) en bazos (figura 4) de animales tratados con la bacteria. Estos resultados indican claramente la estimulación de una respuesta inmune innata en los ratones inmunizados.

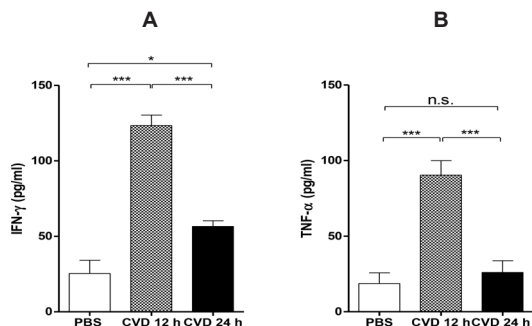


Figura 2. Niveles de IFN- γ (A) y TNF- α (B) en sobrenadantes de cultivo de células provenientes de placas de Peyer de ratones a 12 y 24 h de la administración o.g. de CVD 915 o PBS como control. N=3-6, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, según ANOVA y el posterior test de Tuckey.

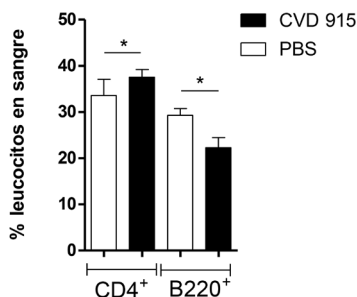


Figura 3. Poblaciones celulares en Sangre luego de 24 h de la administración o.g. de la CVD 915 o PBS como control. N=9, * $p < 0,05$, según el test de Mann Whitney.

El tratamiento profiláctico con la CVD 915 disminuye la incidencia y el volumen de las metástasis hepáticas. Para los ensayos preclínicos, administramos las bacterias por vía oral 24 h antes del desafío con el modelo de metástasis hepáticas. A los 21 ± 1 días, se evaluó la eficacia terapéutica, y encontramos que el número de metástasis (figura 5 A) y el volumen tumoral total (figura 5 B), de los hígados de ratones tratados, era significativamente menor que el de los hígados de los ratones control. Asimismo, el peso total de los hígados de los animales inmunizados fue menor que el de los controles (figura 5 C). Estos contundentes resultados nos demuestran la eficacia terapéutica de esta simple inmunoterapia.

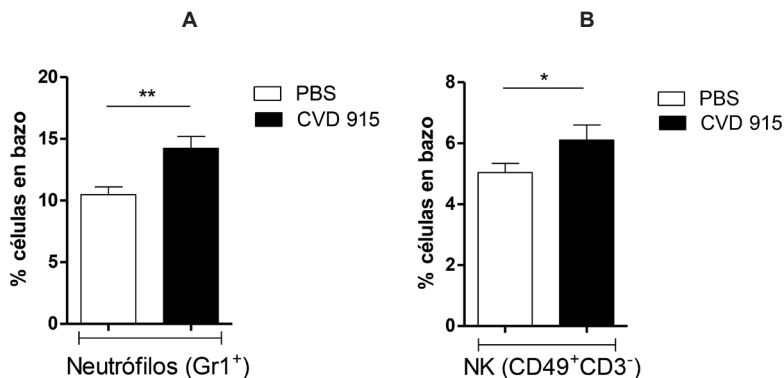


Figura 4. Poblaciones celulares en Bazo luego de 24 h de la administración o.g. de la CVD 915 o PBS como control. A) % de células NK en la región de linfocitos. B) % de células Gr1⁺ en la región de granulocitos. N=11-14, *p<0,05, **p<0,01, según el test de t de Student.

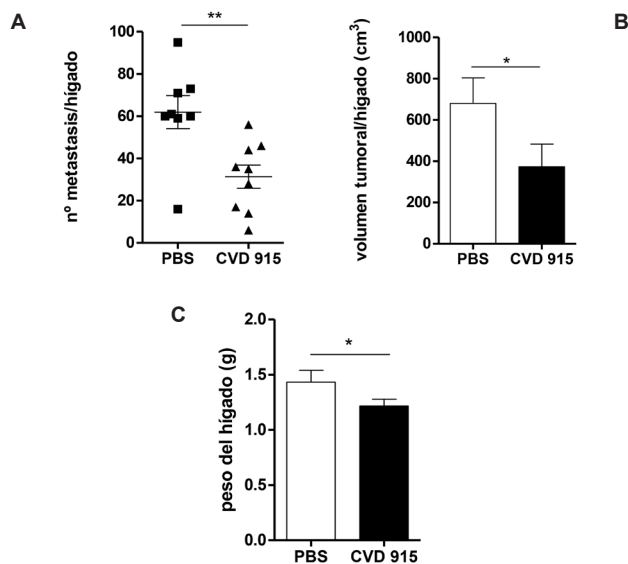


Figura 5. Número (A) y volumen total (B) de las metástasis hepáticas, luego de 21 días del desafío tumoral. N= 8-9, *p<0,05, **p<0,01, según el test de Mann Whitney. C) Peso de los hígados, luego de 21 días del desafío tumoral. N=14-20, *p<0,05 según el test de t de Student.

La *Salmonella* CVD 915 aumentó la frecuencia de linfocitos T en LNM luego del desafío tumoral. El estudio de las poblaciones celulares de los linfonódulos mesentéricos (LNM) a este tiempo, en el que se reveló una disminución en la incidencia de metástasis hepáticas, indicó un aumento de las poblaciones de linfocitos T ($CD3^+$) y de neutrófilos ($Gr1^+$), así como una disminución de la población de linfocitos B ($B220^+$) en los animales que recibieron las bacterias previamente al desafío tumoral (figura 6). El aumento de la proporción de células $CD3^+$, nos indica una activación de esta población celular en los LNM.

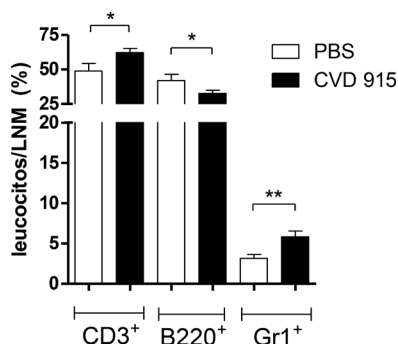


Figura 6. Poblaciones de leucocitos en LNM a 21 días del desafío tumoral. N=5-8, * $p < 0,05$, según el test de Mann Whitney.

El tratamiento preventivo con la *Salmonella* Typhi CVD 915 indujo una respuesta inmune celular de tipo Th1 en hígado luego del desafío. El análisis de las poblaciones celulares de las células inmunes intrahepáticas (CIH), en los ratones luego de 21 días del desafío tumoral, arrojó que los animales tratados poseían un aumento significativo en la población de linfocitos $CD4^+$ (figura 7 A), con respecto a los controles. Incluso, las CIH provenientes de ratones tratados, produjeron mayores niveles de las citoquinas del tipo Th1, $TNF-\alpha$ e $IFN-\gamma$, que las de los ratones control, al ser cultivadas ex vivo durante 96 h. Esto fue demostrado al analizar la concentración de estas citoquinas en el sobrenadante de los cultivos, mediante un ELISA (figura 7 B). Estos resultados nos demuestran la presencia de una respuesta adaptativa del tipo Th1 en el órgano blanco de las metástasis.

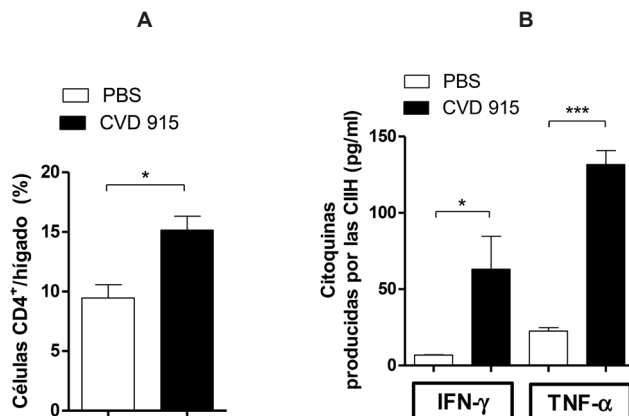


Figura 7. A) Poblaciones de linfocitos CD4⁺ en el hígado a 21 días del desafío tumoral. N=3-5, *p<0,05, según el test de Mann Whitney. Un experimento representativo de dos. **B)** Niveles de citoquinas (IFN-γ y TNF-α) producidas ex vivo, en cultivo de 96 h, por las células inmunes intrahepáticas (CIH) extraídas luego de 21 días del desafío tumoral. N=3-4, *p<0,05, ***p<0,001, según el test de t Student.

El tratamiento con la *Salmonella* CVD 915 es inocuo. No se encontró diferencia en la ganancia de peso corporal entre los grupos de ratones estudiados (p>0,05). Debido a que los animales en experimentación no sufrieron pérdida de peso durante el período en el que se evidencia el efecto terapéutico, y que el peso corporal es tomado como un parámetro de salud, se puede inferir que el tratamiento es inocuo.

CONCLUSIONES

Todos estos resultados, nos permiten concluir que la inoculación oral con esta cepa vacunal de *Salmonella* Typhi, CVD 915, el día previo al desafío tumoral, promueve tempranamente una respuesta inmune innata en el huésped, que evita la implantación de metástasis hepáticas, o bien, que favorece el rechazo de las mismas, mediante mecanismos inmunológicos que involucren una respuesta inmune innata y adaptativa. Esto, deriva en una menor incidencia de metástasis hepáticas y una menor masa tumoral total, sin perjuicio en la salud del huésped. Esta simple inmunoterapia preventiva, merece

ser evaluada en profundidad, para ser utilizada sola o en combinación con otras terapias, en pacientes con cáncer ante el riesgo de metástasis, e incluso, podría tener notables ventajas terapéuticas sobre los métodos convencionales actualmente utilizados en la lucha contra esta enfermedad.

ABSTRACT

The liver is a frequent target for metastasis. Radiotherapy and chemotherapy are used to prevent the occurrence of these metastatic foci. However, these treatments used in high doses are unsafe to patients. Previously, we demonstrated the antitumor therapeutic efficacy of an attenuated vaccine strain of *Salmonella* Typhi (CVD 915), administered subcutaneous and intratumoral, on the evolution of primary tumors of different histological origin and their metastases. The orally administered *Salmonella* can colonize the gut-associated lymphoid tissue, Peyer's patches, mesenteric lymph nodes and liver, contributing to immune recognition and elimination of tumor liver metastases. Our aim was to test whether oral immunization with *Salmonella* was able to exert an antitumor effect on metastasis, in a mouse model of liver metastasis of a mammary adenocarcinoma. This monotherapy was not toxic and able to significantly reduce the number and size of liver metastases. Furthermore, generated innate proinflammatory immune response, within the first 24 h after administration of the *Salmonella*, mainly characterized by increased NK cells and neutrophils, and the production of cytokines such as IL-12, TNF- α and INF- γ in liver, spleen or Peyer's patches. We assume, that this inflammatory response was essential to the early elimination of tumor cells in the liver, and to generate antitumor immunity. Moreover, at 21 days of treatment, we detected a cellular Th1 immune response with high levels of TNF- α and INF- γ produced by intrahepatic immune cells. This response is critical for tumor eradication. These results demonstrate that the prophylactic vaccination with *Salmonella* induced a clinically efficient immune response that protected the host against a subsequent challenge with mammary adenocarcinoma cells, promoting growth inhibition of liver metastasis. This simple immunotherapy may be used in patients at risk of developing metastasis, and even combined with other therapies for the treatment of cancer.

BIBLIOGRAFIA

1. Blom KG, Rahman Qazi M, Noronha Matos JB y col. *Clinical and Experimental Immunology*, 155: 320–329, 2008.
2. Chorobik P, Marcinkiewicz J, *Polish Archives of Internal Medicine* 121 (12): 461-467, 2011
3. Coley WB. *Trans Am Surg Assoc* 12:183, 1984.
4. Curtis J. L y Punturieri A. *Am J of Resp Cell and Molec Biol*, 28:541, 2003.
5. Demicheli R, Abbattista A, Miceli R y col. *Breast Cancer Res & Treat*, 2 (41):177-185, 1996.
6. Feldman JP. *Journal of Applied Quantitative Methods*, 4 (4):455-462, 2009.
7. Feltis BA, Miller JS, Sahar DA y col. *Journal of Surgical research*, 107:101, 2002.
8. Lafreniere R, Rosenberg S. J. *Natl. Cancer Inst*, 76:309, 1986.
9. Pawelek J, Low KB, Bermudes D. *Cancer Research*, 57:4537-4544, 1997.
10. Retsky M, Bonadonna G, Demicheli R y col. *Breast Cancer Res*, :R372-R374, 2004
11. Soto III LJ, Sorenson BS, Kim AS y col. *Pediatr Surg* 38:1075-1079.2003
12. Urtreger A, Ladedá V, Puricelli L y col. *Inter. J. Oncol*, 11:489, 1997.
13. Vendrell A, Gravisaco M.J, Pasetti M.F y col. *Vaccine*, 29:728, 2011.
14. Vendrell A, Gravisaco MJ, Goin JC, y col. *J Immunother*, 36(3):171-180, 2013.
15. Wang JY, Pasetti M, Noriega F y col. *Infection and Immunity*, 69:4734, 2001.

SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO: UN PROBLEMA DE TRANSPORTE. EFECTO DE LA TOXINA SHIGA SOBRE CÉLULAS ENDOTELIALES DEBIDO AL INGRESO POR MACROPINOCITOSIS Y/O ENDOCITOSIS MEDIADA POR RECEPTORES

Dr. Diego Luis Viale

Escuela de Ciencia y Tecnología – Universidad Nacional de San Martín

INTRODUCCIÓN

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es una enfermedad asociada al agente etiológico *Escherichia coli* productor de la toxina Shiga (STEC -Shiga toxin-producing *Escherichia coli*) (Banatvala, Griffin et al. 2001). Esta enfermedad afecta mayormente a los niños menores de 5 años, llevando en los casos más extremos a la insuficiencia o trasplante renal. La toxina Shiga es el factor de virulencia responsable del SUH y es introducida por la bacteria desde el intestino al torrente sanguíneo (Melton-Celsa, Rogers et al. 1998). La base patogénica del SUH está determinada por el daño de las células endoteliales que forman parte de los pequeños vasos del colon, riñón y sistema nervioso central. Este efecto se produce a partir del ingreso al citoplasma celular de la subunidad A de la toxina Shiga que corta el ARN ribosomal 28S. Esto provoca la inhibición de la síntesis proteica y la consecuente muerte celular (Endo, Tsurugi et al. 1988).

El glicolípido Gb3 es el responsable de la endocitosis de la toxina (Pudymaitis, Armstrong et al. 1991). Aunque recientemente se ha descrito la entrada de la toxina en células epiteliales de colon que no expresan Gb3 mediado por macropinocitosis (Malyukova, Murray et al. 2009), indicando que la toxina puede tener efecto sobre tejidos que no expresen el receptor Gb3.

Por otro lado, las células endoteliales necesitan del receptor Gb3 para permitir la endocitosis de la toxina Shiga (Schweppe, Bielaszewska et al. 2008), aunque aún no se ha reportado la ausencia de Gb3 en este tipo celular.

Estos datos indican que no solo las células que expresan Gb3 pueden estar involucradas en el daño producido al tejido renal o nervioso y el estudio de la vía de ingreso de la toxina en las células endoteliales podría explicar el efecto observado sobre otros tejidos. Además, este estudio podría permitir el

desarrollo de compuestos nanotecnológicos capaces de bloquear el ingreso de la toxina Shiga a las células endoteliales y, de esta forma, evitar el efecto patogénico sobre este tipo celular.

Aunque existen anticuerpos capaces de marcar la toxina Shiga, el anticuerpo puede perjudicar la endocitosis de la toxina y su seguimiento intracelular. El objetivo de este nuevo proyecto multi-disciplinario es el desarrollo de una herramienta para trazar la presencia de la toxina de forma intracelular. El proyecto comprende la utilización de aptámeros de ADN de unión específica a la toxina Shiga unidos a nano-partículas fluorescentes (quantum dots) que unan la toxina Shiga. La ventaja de utilizar quantum dots es su menor tamaño (4-7nm) y la posibilidad de obtener diferentes marcas bajo la excitación con una sola longitud de onda, permitiendo también evaluar otros trazadores. Estos nano-trazadores permitirían el seguimiento en tiempo real del transporte intracelular de la toxina para evaluar el efecto sobre estas células endoteliales *in vitro* e *in vivo*.

RESULTADOS

En una primera etapa se produjo una biblioteca de secuencias al azar de ADN conteniendo 10^{15} especies diferentes de oligonucleótidos. Estos elementos estaban compuestos por una región central de 40 nucleótidos al azar y se utilizaron los cebadores H1 (5'-CGGAATTCCGAGCGTGGGCGT-3') y H2 (5'-CTCGAGCGTGGGCGTA-3') para amplificar mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para realizar la selección del aptámero capaz de unirse a la toxina Shiga se sintetizaron péptidos sintéticos correspondientes a los sitios de unión (I y III) de la subunidad B de la toxina Shiga al receptor celular Gb3. Estos péptidos se denominaron Stx2-1 (DGKEYWTSRWNLQ) y Stx2-2 (KSSTCESGS-GFAE). Cincuenta microgramos de los péptidos se dejaron adsorber sobre membrana de nitrocelulosa para permitir la ligación a la superficie. Luego, el fragmento conteniendo los péptidos se incubó con la biblioteca de ADN con agitación durante la noche para obtener los aptámeros con capacidad de unión a los péptidos Stx2-1 y Stx2-2.

Inicialmente se realizó una única selección de aptámeros sin obtener resultados positivos. A partir de estos resultados se procedió a realizar mayor cantidad de ciclos de selección y se obtuvieron cinco clones que se unían al péptido Stx2-1 (clones 22, 23, 24, 26 y 28).

Estos clones de aptámeros fueron utilizados para evaluar su capacidad de unión a un lisado de bacterias que expresan la toxina Shiga. En ninguno de los casos se observó marca positiva pero esto podía deberse a que la proteína bajo estas condiciones se encuentra desnaturalizada. Vale resaltar que estos resultados no indican que estos clones no sean capaces de unirse a la toxina Shiga en estado nativo. El mejor método para evaluar su capacidad de unión a la proteína nativa fue mediante el bloqueo de su capacidad toxica sobre un cultivo de células Vero. Este método puede ser utilizado debido a que los aptámeros fueron diseñados para unirse a las regiones de la toxina Shiga involucradas en el pegado al receptor celular Gb3. La utilización de los clones de aptámeros sobre un cultivo celular produciría una disminución o la inhibición de efecto tóxico sobre las células evaluadas.

A partir de la obtención de los posibles clones con capacidad de unión al péptido Stx2-1, contenido en la región I de la toxina Shiga, se decidió evaluar su efecto sobre la viabilidad de células Vero. Este método biológico permite cuantificar mediante diluciones la sobrevivencia de células al efecto mediado por la toxina Shiga y evaluar el efecto de los aptámeros seleccionados.

A partir de este ensayo pudimos observar que el clon 23 del aptámero posee el mismo efecto que la presencia de una biblioteca de ADN al azar. Indicando que el clon 23 no modifica *per se* la toxicidad de la toxina Shiga (Figura 1). Se realizó el mismo experimento con los diferentes clones 24, 26 y 28 y tampoco se observó un efecto sobre la sobrevivencia (datos no mostrados).

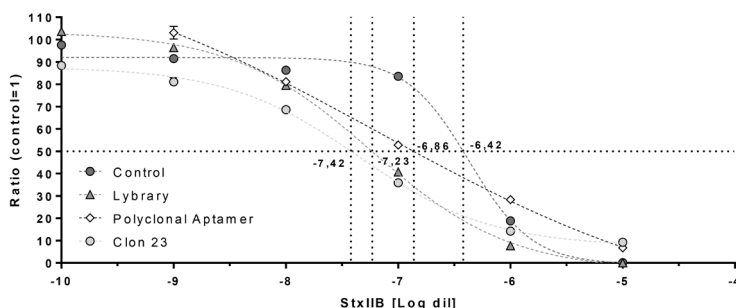


Figura 1: Efecto de los aptámeros sobre la sobrevivencia celular. Las células Vero fueron incubadas durante 72 horas con diluciones de lisado bacteriano conteniendo toxina Shiga y se evaluó la sobrevivencia mediante el método de cristal violeta.

Una de las posibles explicaciones para este resultado podría ser que la unión al péptido de los clones seleccionados era interferida por el contexto en el que se encuentra la secuencia en la proteína ensamblada. Con el objetivo de evaluar si el aptámero podría unirse al péptido inserto en la secuencia proteica se inició una nueva estrategia.

Inicialmente se clonó la proteína quimera GST-Stx2B que contiene la subunidad B de la toxina Shiga (stx2B) unida a la proteína Glutación S-transferasa (GST). Esta proteína fue purificada mediante el uso de resinas conteniendo glutatión y la posterior elución mediante exceso de Glutatión. Se obtuvo proteína purificada y a partir de la producción de GST-Stx2Ba se procedió a evaluar los clones antes descritos. Todos los clones poseen capacidad de unión a la proteína recombinante aunque no tienen efecto sobre la entrada de la toxina Shiga a la célula (**Figura 2**).

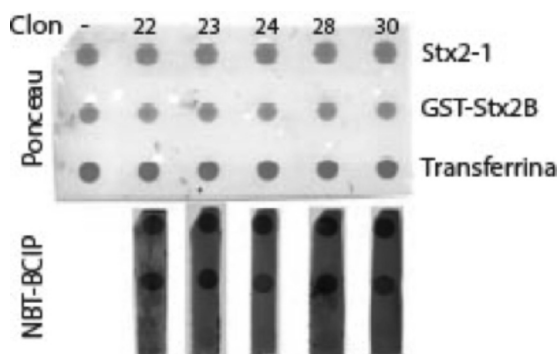


Figura 2: Clones de aptámeros con capacidad de unión al péptido Stx2-1 y a la proteína recombinante GST-Stx2B.

El péptido y la proteína recombinante GST-Stx2B fueron sembradas en una membrana mediante técnica de Dot-blot y evaluada sus concentraciones mediante técnica de Ponceau. Posteriormente, la membrana fue incubada con los diferentes clones de aptámeros indicados conteniendo biotina en uno de sus extremos. Luego fue incubada con la proteína Avidina ligada a fosfatasa alcalina y revelada mediante tinción con NBT-BCIP.

Aunque pudimos evaluar que el efecto mediado por estos clones no era el deseado. Se pudo utilizar la proteína recombinante para realizar una nueva selección de aptámeros contra toda la secuencia proteica y de esta forma obtener un clon capaz de marcar la proteína en el contexto celular.

La fracción enriquecida por este paso de selección fue amplificada por PCR para continuar con el proceso de selección del mejor aptámero. Los pocos clones de aptámeros conseguidos contra GST-Stx2B reaccionaban también contra la proteína GST control, indicando que el aptámero no se unía a la región conteniendo la toxina Shiga sino a la región GST (datos no mostrados). Este resultado era posible debido a que la proteína GST (kDa) tiene un tamaño 4 veces mayor que la toxina Shiga (7 kDa).

A partir de estos resultados, se realizaron 8 ciclos de selección y no se obtuvo ningún clon capaz de reconocer al péptido o GST-Stx2B. A partir de los resultados obtenidos mediante diferentes métodos se procedió a amplificar la biblioteca de aptámeros mediante el uso de otra polimerasa pero tampoco se obtuvieron resultados.

Con la decisión de encarar otra estrategia para lograr la marcación de la toxina shiga, se inició una colaboración con el laboratorio dirigido por el Dr. Carlos Gabriel Briones del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas – UNSAM en donde se inmunizaron ratones con la proteína GST-Stx2B para obtener anticuerpos poli- o mono-clonales. Se obtuvo un anticuerpo policlonal que reaccionaba tanto contra la proteína GST purificada como contra GST-Stx2B, aunque no puede reaccionar contra un lisado de bacterias que expresan la proteína toxina Shiga (**Figura 3**). Esta baja afinidad del anticuerpo poli-clonal se confirmó mediante ensayos de sobrevida celular en los que no se observó efecto del anticuerpo (datos no mostrados).

El clonado de estos anticuerpos permitiría obtener un anticuerpo monoclonal con mayor afinidad y capacidad de unión a la toxina Shiga para poder ser utilizado en el seguimiento de la proteína en las células endoteliales.

Estos resultados indicaron que los aptámeros desarrollados no eran capaces de unirse de manera específica a la toxina Shiga y que no se podía continuar con la metodología realizada para obtener trazadores sobre células endoteliales.

Debido a que la primera parte de este proyecto no se pudo completar y no se obtuvieron clones capaces de ser unidos a los nanotrazadores, no se solicitó la segunda fase del dinero asignado a este proyecto. La segunda etapa involucraba el desarrollo de los nanotrazadores mediante quantum dots unidos a aptámeros específicos contra la toxina Shiga y que sean capaces de ser endocitados por la célula.

Debido a la dificultad de obtener un aptámero capaz de unirse a la toxina Shiga, se decidió comenzar con estrategias mediadas por anticuerpos que aún se encuentran en desarrollo.

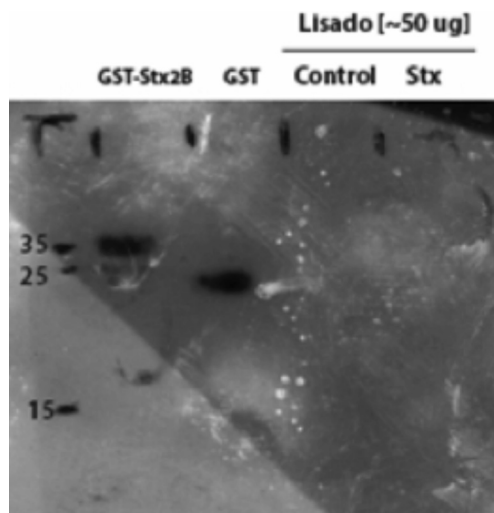


Figura 3. Western Blot contra Toxina Shiga. Se corrió en un gel de poliacrilamida la proteína recombinante GST-Stx2b, la proteína carrier GST, lisado de bacterias control o con expresión de toxina Shiga (Stx). La membrana bloteada fue incubada con suero policlonal de ratones inmunizados con GST-Stx2B [1/1500] y luego con anticuerpo 2rio de conejo anti-ratón ligado a HRP y revelado con luminol.

ABSTRACT

Hemolytic Uremic syndrome (HUS) is a disease characterized by bloody diarrhea, anemia and, in some cases, kidney failure. This disease have been clearly associated to the Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) or *Shigella dysenteriae* (Karmali, Steele et al. 1983, Karmali, Petric et al. 1985). Moreover, infection with STEC is the major cause associated with acquired renal failure in childhood (Trachtman and Christen 1999). Bacteria delivers the virulence factor Shiga toxin from gut lumen into bloodstream (Melton-Celsa, Rogers et al. 1998). The pathophysiology of the disease involves endothelial cell damage and activation of small vessels from kidney, colon and central nervous system. The molecular events involves cytoplasmic delivery of A subunit from Shiga toxin, mediated by a Shiga toxin B pentameric structure. The A subunit cuts 28S ribosomal RNA from ribosome structure. The latter effect inhibits protein synthesis and, consequently, induces apoptosis (Endo, Tsurugi et al. 1988).

One strategy to evaluate the effect over endothelial cells involves the development of an aptamer capable of track the cellular movement of Shiga toxin. We developed aptamers that bind a peptide from B subunit form Shiga toxin type II but it didn't recognize the full protein. We tried to develop aptamers that bind full B subunit protein but results were negative. Although this strategy did not get the expected results, we started a strategy to develop an antibody that recognize the B subunit from Shiga toxin.

REFERENCIAS

1. Banatvala, N., P. M. Griffin, K. D. Greene, T. J. Barrett, W. F. Bibb, J. H. Green, J. G. Wells and C. Hemolytic Uremic Syndrome Study (2001). "The United States National Prospective Hemolytic Uremic Syndrome Study: microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings." *J Infect Dis* **183**(7): 1063-1070.
2. Endo, Y., K. Tsurugi, T. Yutsudo, Y. Takeda, T. Ogasawara and K. Igarashi (1988). "Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins." *Eur J Biochem* **171**(1-2): 45-50.
3. Karmali, M. A., M. Petric, C. Lim, P. C. Fleming, G. S. Arbus and H. Lior (1985). "The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*." *J Infect Dis* **151**(5): 775-782.
4. Karmali, M. A., B. T. Steele, M. Petric and C. Lim (1983). "Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools." *Lancet* **1**(8325): 619-620.
5. Malyukova, I., K. F. Murray, C. Zhu, E. Boedeker, A. Kane, K. Patterson, J. R. Peterson, M. Donowitz and O. Kovbasnjuk (2009). "Macropinocytosis in Shiga toxin 1 uptake by human intestinal epithelial cells and transcellular transcytosis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **296**(1): G78-92.
6. Melton-Celsa, A. R., J. E. Rogers, C. K. Schmitt, S. C. Darnell and A. D. O'Brien (1998). "Virulence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in orally-infected mice correlates with the type of toxin produced by the infecting strain." *Jpn J Med Sci Biol* **51 Suppl**: S108-114.
7. Pudymaitis, A., G. Armstrong and C. A. Lingwood (1991). "Verotoxin-resistant cell clones are deficient in the glycolipid globotriosylceramide: differential basis of phenotype." *Arch Biochem Biophys* **286**(2): 448-452.

8. Schweppe, C. H., M. Bielaszewska, G. Pohlentz, A. W. Friedrich, H. Bunttemeyer, M. A. Schmidt, K. S. Kim, J. Peter-Katalinic, H. Karch and J. Muthing (2008). "Glycosphingolipids in vascular endothelial cells: relationship of heterogeneity in Gb3Cer/CD77 receptor expression with differential Shiga toxin 1 cytotoxicity." Glycoconj J **25**(4): 291-304.
9. Trachtman, H. and E. Christen (1999). "Pathogenesis, treatment, and therapeutic trials in hemolytic uremic syndrome." Curr Opin Pediatr **11**(2): 162-168.

RECONSTITUCIÓN DE LA BARRERA QUÍMICA INTESTINAL POR ENTEROGLUCAGON TIPO GLUCAGON-LIKE PEPTIDE 2 (GLP-2).

Silvina S M Villanueva, Agostina Arias, Virginia G Perdomo, Juan P Rigalli,
María L Ruiz, Viviana A Catania, Aldo D Mottino.

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET), Facultad de Cs Bioquímicas
y Farmacéuticas, UNR.

SÍNTESIS DEL INFORME FINAL

Además de su función primaria de absorción de agua y nutrientes, el intestino delgado posee la capacidad de actuar como barrera química contra el ingreso de sustancias nocivas, mayormente incorporadas con la dieta. Dicha capacidad depende de la presencia de sistemas de biotransformación intracelular, tal como el sistema Glutathione S-transferasa (GST) y de transporte, tal como la Proteína asociada a Resistencia a Multidrogas 2 (MRP2) a nivel apical. GST, de localización citosólica, constituye uno de los principales sistemas implicados en las reacciones de conjugación de fase II y sus productos, derivados conjugados, son eliminados del enterocito por vía apical a través de transportadores específicos, tales como MRP2 (ABCC2). Esta bomba exportadora es un importante miembro de la familia de transportadores ABC (ATP-Binding Cassette), localizada en la membrana apical del enterocito maduro (Mottino y col., 2000), la cual presenta selectividad por compuestos aniónicos, libres o conjugados con ácido glucurónico, glutathione, o sulfato. Ambos sistemas, GST y MRP2, comparten un gradiente común de expresión: se encuentran preferencialmente en el intestino proximal (duodeno y yeyuno), decreciendo su expresión hacia el íleon y prevaleciendo en la punta de la vellosidad respecto de la cripta (Mottino y col., 2000); a la vez que presentan la particularidad de ser inducidos por ciertos xenobióticos comunes, lo que ha dado validez a la consideración de que ambos pueden regularse en forma conjunta (Catania y col., 2004). Su función principal, por ende, es limitar el pasaje de xenobióticos desde la luz intestinal al enterocito al devolver sus metabolitos conjugados a la luz para su eliminación definitiva del organismo. Esto los convierte en la primera barrera química de protección contra la llegada de sustancias nocivas, tanto por ingesta como por vía biliar.

Por consiguiente, la inducción simultánea de dichos sistemas cobraría gran interés ante cuadros de potencial toxicidad, donde los mecanismos involucrados en la detoxificación de sustancias resultan alterados o insuficientes. Al respecto, se sabe que la función de barrera epitelial puede debilitarse severamente en diversas patologías intestinales que cursan con erosión o atrofia o pérdida del epitelio, así como también en la resección quirúrgica de un fragmento intestinal (Sigalet y col., 2000). Interesantemente, bajo estas circunstancias, se ha demostrado un incremento en la producción y secreción de una hormona local hipertrófica: el enteroglucagon en su forma glucagon-like peptide 2 o GLP-2 (Sigalet y col., 2000; Xiao y col., 2000). GLP-2 es miembro de una familia de hormonas peptídicas denominada "super familia del glucagon", en virtud de la gran homología en su secuencia de aminoácidos con el glucagón y es producida exclusivamente en las células enteroendocrinas L, que son abundantes en el yeyuno distal, ileon y colon (Wallis y col., 2007). GLP 2 actúa a través de un receptor específico acoplado a proteína G (GLP-2R), el cual es predominantemente localizado en el intestino delgado proximal (Cheeseman 1997; Guan y col., 2003), por lo que sus propiedades tróficas son muy selectivas particularmente en el yeyuno, donde regula la morfología, función e integridad de la mucosa, tanto durante el desarrollo como en el adulto (Lovshin y col., 2000; Drucker y col., 1996). GLP-2 también está asociado con el crecimiento y adaptación intestinal en una variedad de condiciones patológicas, incluyendo adaptación intestinal pos-resección (Martin y col., 2005), atrofia intestinal inducida por nutrición parenteral (Niinikoski y col., 2004) y síndrome del asa corta (Schmidt y col., 2000). Además, los niveles de dicha hormona se encuentran marcadamente incrementados en ratas madres durante la lactancia, representando una adaptación fisiológica relacionada con la mayor demanda energética, y por ende, ingesta de alimentos, en clara asociación con un aumento en la longitud, peso y fundamentalmente superficie del intestino delgado (Fell y col., 1963). Previamente, ante la hipótesis de una relación entre GLP-2 y la función de barrera química intestinal, comprobamos que efectivamente las ratas madres en lactancia muestran un incremento en la excreción intestinal de xenobióticos aniónicos conjugados junto a un aumento paralelo en la expresión de Mrp2 (Mottino y col., 2001), restando demostrar si GLP-2 podría ser responsable de esos efectos. Esta hipótesis fue recientemente confirmada en estudios realizados en ratas hembras normales, donde comprobamos la acción inductora de GLP-2 (recombinante de rata, i.p.) sobre la expresión y actividad de GST y Mrp2, en este último caso extendiéndose hasta zonas

más profundas de la vellosidad, siendo dicha modulación a nivel transcripcional y mediada por activación de adenilato ciclasa (Villanueva y col., 2010). Estos resultados, en conjunto, sugieren que la acción hipertrófica de GLP-2 es acompañada de un efecto estimulador de los sistemas de biotransformación y excreción de xenobióticos y que esta regulación positiva de la barrera química intestinal se promueve tanto en condiciones fisiológicas (crecimiento y lactancia) como en respuesta compensadora a situaciones patológicas como las mencionadas más arriba. Se desconoce hasta el presente, si GLP-2 ejerce alguna acción moduladora sobre la dupla GST-MRP2 en epitelio intestinal humano. Por ello, el **OBJETIVO GENERAL** del presente proyecto fue **evaluar la acción de GLP-2 sobre la expresión y actividad de GST y MRP2 en un modelo de epitelio intestinal humano, constituido por el cultivo de células Caco-2, contemplando los efectos a largo plazo así como los mecanismos moleculares subyacentes**. Este objetivo, en definitiva, está orientado a determinar si GLP-2 podría representar una herramienta terapéutica en la recuperación de una función vital del intestino, como lo es la función de “barrera química intestinal”, lo cual sería de gran beneficio en determinadas situaciones de disfunción de la misma por deterioro patológico o por resección quirúrgica del intestino.

En el presente trabajo, se demuestra que GLP-2-recombinante humano es capaz de inducir la expresión y actividad de GST α y MRP2 de origen humano, como evidencia de un rol adicional de GLP-2 que favorece la protección del tejido intestinal, en crecimiento o regenerante, contra un potencial daño químico. El aumento de los niveles de ARNm de dichos sistemas sugiere además una regulación a nivel transcripcional. Mecánicamente, se observó que el tratamiento de las células Caco-2 con GLP-2 conduce a un aumento de AMPc intracelular, indicando implícitamente activación de adenilatociclasa (AC). En este sentido, experimentos complementarios determinaron que la regulación de GST y MRP2 por GLP-2 es mediada por tal aumento de AMPc, dado que el tratamiento de las células con el análogo permeable de AMPc, DB (Dibutiril-AMPc), fue capaz de reproducir la inducción de los sistemas GST y MRP2 por GLP-2. La participación de la quinasa PKA, principal blanco del AMPc, queda demostrada al resultar bloqueada dicha inducción ante el pre-tratamiento con el inhibidor específico H89.

La vía cascada abajo pos-activación de AC-PKA que conlleva a la transcripción de los genes blancos GST y MRP2, es desconocida pero podría implicar la participación de ciertos factores de transcripción. El antecedente de que en modelos *in vitro* de células transfectadas con el GLP-2R, el tra-

tamiento con GLP-2 activa la vía PKA/AP-1 conduciendo a la transcripción de genes dependientes (Munroe y col., 1999; Yusta y col., 1999) y que las regiones promotoras de los genes de GST y MRP2 contienen secuencias de nucleótidos capaces de interactuar con la familia de factores de transcripción AP-1 (Pinkus y col., 1993; Stöckel y col., 2000), nos condujo a examinar la expresión y el estado de fosforilación de algunos miembros candidatos de la familia AP-1. La familia AP-1 incluye homo o heterodímeros compuestos de subunidades de Jun, Fos o ATF que se unen a un sitio común en el ADN (sitio de unión de AP-1) (Karin y col., 1997). Los resultados del presente trabajo indican un aumento de la expresión de C-JUN pero no de C-FOS ni de ATF2, al mismo tiempo, se observó un aumento de las formas fosforiladas p-C-JUN y p-ATF2, muy significativo en este último caso; lo que condujo a un aumento de la relación p-ATF2/ATF2 sin cambio en la relación p-C-JUN/C-JUN. Esto concuerda con la bibliografía que indica que a diferencia de c-JUN y c-FOS, la expresión de ATF2 es constitutiva y su actividad está regulada por fosforilación (Karin y col., 1997). Además, es importante destacar el hecho que la fosforilación de estos factores de transcripción es crítica para regular la expresión de genes blancos. No obstante, falta demostrar fehacientemente y mediante experimentos apropiados, que ambos factores de transcripción estarían interactuando entre sí para formar el heterodímero C-JUN/ATF2 y de esta forma interaccionar con el sitio AP-1 de las regiones promotoras de GST y MRP2. A favor de esta posibilidad, se sabe que la formación del heterodímero C-JUN/ATF2 prevalece ante los homodímeros C-JUN/C-JUN o ATF2/ATF2 y que la heterodimerización de ATF2 con C-JUN es crítica para la localización nuclear y la actividad transcripcional de este complejo (Liu y col., 2006), a la vez que fue descrito que dicho heterodímero se une al propio promotor de C-JUN formando así un bucle de autorregulación positivo (Whitmarsh y col., 1996). Finalmente, las diferentes quinasas son extremadamente específicas y están implicadas en la activación de AP-1 a través de la fosforilación de diferentes sustratos. En este sentido, se pudo comprobar que la fosforilación de ATF2 es dependiente de PKA, dado que fue bloqueada por el pre-tratamiento con H89 y que la forma fosforilada fue reconocida por el anticuerpo específico anti-sustratos fosforilados por PKA. Por ende nuestra hipótesis, en base a nuestros resultados y a la evidencia previa, es que la activación de ATF2 dependiente de su fosforilación, que parece estar regulado por PKA, puede desempeñar un papel importante en la respuesta génica de GST y MRP2 por propiciar la inducción de la expresión de C-JUN e interactuar conjuntamente con este sobre los respectivos sitios AP-1.

En conclusión, GST y MRP2 de origen humano son inducidos por GLP-2 a nivel transcripcional, a través de la vía AMPc-PKA y esto podría estar mediado por un mecanismo dependiente de factores de transcripción de la familia AP-1.

APLICABILIDAD POTENCIAL DE LOS PRESENTES HALLAZGOS:

La aplicabilidad clínica de los resultados se garantiza por ser el modelo de células Caco-2 ampliamente aceptado como emulo del epitelio intestinal humano y porque reafirmarían la utilización de GLP-2 como estrategia terapéutica novel para promover la regeneración de la estructura intestinal y acondicionar el epitelio intestinal para rechazar selectivamente sustancias nocivas.

NOTAS:

- Parte de los resultados del presente trabajo fueron presentados en la reunión anual de la Sociedad Argentina de Fisiología, realizado en Rosario el 4 y 5 de octubre de 2012. Título y autores de la presentación: “Inducción de la proteína asociada a resistencia a multidrogas 2 (MRP2) por enteroglucagon tipo 2 (GLP-2) en células caco-2”. Villanueva S, Arias A, Perdomo VG, Rigalli JP, Ruiz ML, Luquita MG, Catania V, Mottino AD.
- Actualmente, con el fin de consolidar el presente trabajo, se están ejecutando experimentos apropiados que tienen como objetivo demostrar la interacción c-JUN/ATF2 y su unión al sitio AP-1 de las regiones promotoras de los genes *GST* y *MRP2*.

ABSTRACT

In this work, we demonstrate that the treatment of Caco-2 cells, an *in vitro* model of intestinal epithelium, with GLP-2 (human recombinant, 10 μ M) for 48 hs is capable of inducing the expression and activity of intestinal glutathione transferase (GST) α class and multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2; ABCC2) of human origin. The increased levels of mRNAs of these systems further suggest regulation at the transcriptional level. Mechanistically, it was observed that the treatment of Caco-2 cells with GLP-2 leads to an increase in intracellular cAMP, thus implicitly indicating adenylate cyclase (AC) activation. In this regard, complementary experiments showed that coordinate regulation of GST α class and MRP2 by GLP-2 is mediated by

increased cAMP, since treatment of cells with the permeable cAMP analog, DB (dibutyryl cAMP, 10 μ M for 48), was able to reproduce MRP2 and GST induction by GLP-2. The participation of PKA, main target of cAMP, was demonstrated since such inductions were blocked by pre-treatment of the cells with the specific inhibitor H89. Pathways downstream of AC-PKA activation, which leads to the transcription of target *MRP2* and *GST* genes, are unknown, but may involve the participation of certain transcription factors. Based on our results and previous evidence, we postulate that ATF2 activation, which is dependent on its phosphorylation, that appears to be regulated by PKA, may play an important role in the response of *GST* and *MRP2* genes by promoting the induction of c-JUN expression and interacting together with c-JUN on the respective AP-1 sites. In conclusion, GST and MRP2 of human origin are induced by GLP-2 at a transcriptional level, through the cAMP-PKA pathway, and this could be mediated by a mechanism dependent on AP-1 transcription factors family. The clinical applicability of these results is guaranteed since Caco-2 cells are widely accepted as emulate of human intestinal epithelium, and because our results reaffirm the use of GLP-2 as a novel therapeutic strategy to promote regeneration of the intestinal structure, thus conditioning the intestinal epithelium to selectively reject harmful substances.

REFERENCIAS

1. Catania y col., 2004. *Ann Hepatol.* 3:11-7, 2004
2. Cheeseman 1997. *Regul. Integr. Comp. Physio.* 273:1965-1971, 1997.
3. Drucker y col., 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 93:7911-7916, 1996.
4. Fell y col., 1963. *J. Pathol. Bacteriol.* 85:179-188.
5. Guan y col., 2003. *Gastroenterology*.125:136-147, 2003.
6. Karin y col, 1997. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9(2):240-246, 1997.
7. Liu y col., 2006. *EMBO.* 25:1058-1069, 2006.
8. Lovshin y col., 2000. *Endocrinology.* 141:4194-4201, 2000.
9. Martin y col., 2005. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288:431-438, 2005.
10. Mottino y col., 2000. *J. Pharm. Exp. Ther.* 293: 717-723, 2000.
11. Mottino y col., 2001. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280:1261-1273, 2001.
12. Munroe y col., 1999. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* 96:1569-1573, 1999.
13. Niinikoski y col., 2004. *J. Nutr.* 134:1467-1474, 2004.

14. Pinkus y col., 1993. *Biochem. Pharmacol.* 26:2359-2363, 1977.
15. Schmidt y col., 2000. *Scand J. Gastroenterol.* 35:522-527, 2000.
16. Sigalet y Martin. *J. Pediatr. Surg.* 35:360-363, 2000.
17. Villanueva y col., 2010. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 335:332-341, 2010.
18. Wallis y col., 2007. *Aliment Pharmacol Ther.* 25:365-372, 2007.
19. Whitmarsh y col., 1996. *J. Mol. Med. (Berl)*. 74(10):589-607, 1996.
20. Xiao y col., 2000. *Am. J. Physiol.* 278: R1057-1063, 2000.
21. Yusta y col., 1999. *J. Biol. Chem.* 74:30459-30467, 1999.